

## Capítol

# 9

# Els mapes de densitat electrònica en l'estat de descans

En aquest capítol es realitza la síntesi de Fourier que permet deduir els mapes axials de densitat electrònica dels caps de miosina. La síntesi es realitza en dos passos, primer solament amb les reflexions 3M i 6M i, després, amb tots els ordres fins la 9M, inclosos els prohibits. Sobre les densitats electròniques resultats, s'apliquen criteris per resoldre la incertesa en  $\pi$  de les fases. Les densitats electròniques restants són ajustades amb l'estructura cristal·logràfica per quantificar l'orientació dels dos caps de miosina que formen el parell.



## 9.1. Introducció

**E**l meridià del diagrama de difracció que genera el múscul en l'estat de descans és molt més complex que el de contracció isomètrica i, per tant, també ho serà el mapa de densitat electrònica a què donarà lloc. Això és així a causa del nombre més elevat de reflexions meridionals i, sobretot, de la presència d'altres estructures periòdiques al sarcòmer, l'amplitud de difracció de les quals interfereix amb la dels caps de miosina (vegeu el capítol 6). Aquesta complexitat porta a que la deducció de la densitat axial de massa dels caps de miosina en l'estat de descans no sigui tan directa com la densitat dels caps en contracció isomètrica.

És a causa d'aquesta complexitat que es deduirà la projecció axial de massa dels caps de miosina en l'estat de descans en dues etapes. En la primera etapa, la síntesi de Fourier (expressió 8.1) es realitzarà tenint en compte únicament les reflexions 3M i 6M utilitzant les fases extrems a la secció 6.2. La projecció axial de massa que resultarà d'aquesta síntesi de Fourier serà comparable a l'obtinguda per a l'estat de contracció isomètrica al capítol precedent.

En un segon pas, es procedirà a elaborar la síntesi de Fourier tenint en compte les reflexions permeses i prohibides de la 2M fins la 9M, ambdues incloses, utilitzant les fases extrems a la secció 6.3 i les amplituds extrems a la secció 7.2. A més, s'inclourà una estimació de la fase i el mòdul del factor d'estructura de la reflexió 1M.

## 9.2. Estructura cristal·logràfica del cap de miosina en descans

### 9.1.1. Elecció de l'estructura cristal·logràfica: 2MYS i 1B7T

D'igual manera que en el capítol anterior en contracció isomètrica, únicament amb el coneixement del mapa axial de densitat electrònica  $r(z)$  no es poden establir conclusions clares a causa de la relativament baixa resolució d'aquesta. El mètode per refinar les conclusions a què donen lloc la deducció de la densitat electrònica axial és l'ajustament a aquesta de l'orientació de l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina.

En el cas de l'estat de descans, però, aquest refinament no és tant inequívoc, donat que l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina sencer amb ATP o ADP-Pi no han pogut ser cristal·litzats per poder resoldre l'estructura per cristal·lografia de proteïnes [Block, 1996]. Donat que, en l'estat de descans no hi ha un enllaç fort entre actina i miosina (vegeu el capítol 1), el cicle d'ATP al múscul en descans estarà primordialment dominat per la presència de caps de miosina amb aquests dos estats [Lynn i Taylor, 1971; Brenner, 1990].

Un mètode utilitzat correntment per superar aquest problema i aconseguir resoldre l'estructura és l'ús d'anàlegs dels diferents estats del nucleòtid (vegeu la secció 1.4.4). Darrerament, s'ha aconseguit resoldre l'estructura del cap de miosina (subfragment S1) complexat amb MgADP [Houdusse *et al.*, 1999] (1056 aminoàcids del subfragment

S1, que inclou les cadenes MHC, ELC i RLC, vegeu la secció 1.2.2). Aquesta estructura, notada amb el codi 1B7T de la *Protein Data Bank* (PDB), se suposa que és la mateixa que l'estructura del cap de miosina amb ADP-Pi i, per tant, semblant a l'estructura del cap amb ATP.

Si bé l'ús d'anàlegs permet la cristal·lització de la proteïna, té igualment dos inconvenients. D'una banda, l'estructura cristal·logràfica obtinguda pot estar alterada respecte de l'estructura nativa del múscul. D'altra banda, l'equivalència de l'anàleg a un dels passos del cicle d'ATP no està clara i és de difícil comprovació.

En conseqüència, per assegurar les conclusions a què s'arriba en aquest treball, la densitat axial de massa en l'estat de descans serà ajustada a dues estructures cristal·logràfiques del cap de miosina:

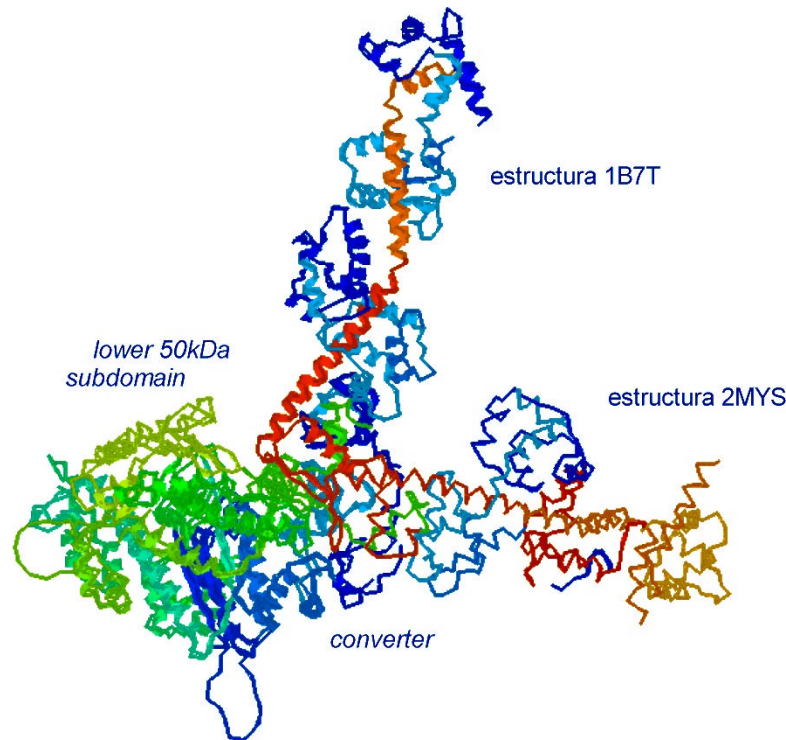
- L'estructura 2MYS [Rayment *et al.*, 1993], utilitzada al capítol 8 per a l'estat de contracció isomètrica. Correspon a l'estat del cap de miosina sense nucleòtid que es dona bàsicament en contracció isomètrica i en *rigor mortis*.
- L'estructura 1B7T [Houdusse *et al.*, 1999], cristal·litzada mitjançant l'anàleg MgADP. És suposat equivalent als estats del cap de miosina amb ADP-Pi i ATP, els més rellevants en descans.

La diferència més important de les dues estructures és la rotació del coll del cap de miosina, que té com a vèrtex un punt proper al subdomini anomenat *converter*, a l'extrem C de la cadena pesada (figura 9.1). A més, hi ha una petita rotació d'un subdomini del domini motor (*lower 50kDa subdomain*) [Houdusse *et al.*, 1999].

La diferent conformació de la cua respecte del domini motor indica que, en cas que aquestes estructures es donin finalment en el múscul viu, aquestes corresponen efectivament a diferents estats del cicle d'ATP del cap de miosina.

Cal afegir que, en el mateix banc de dades PDB, hi ha resoltes moltes altres estructures de cap de miosina que, en principi, podrien ser escollides per a l'ajustament, per exemple les estructures 1BR1, 1BR2, 1BR3, 1BR4 [Dominguez *et al.*, 1998], 1D0X, 1D0Y, 1D0Z [Gulick *et al.*, 2000], 1MMA [Gulick *et al.*, 1997], 1WDC [Houdusse *et al.*, 1996], etc. Això no obstant, aquestes no són utilitzades en aquest treball donat que inclouen només segments del cap de miosina, especialment del domini motor, i no el cap de miosina sencer. Malgrat que a partir dels fragments resolts i amb el coneixement de la seqüència d'aminoàcids s'intenta predir l'estructura secundària i terciària del cap de miosina, el resultat d'aquests càlculs és sovint incert i pot donar solucions no presents al múscul. A més, totes aquestes conformacions del domini motor han estat cristal·litzades amb la inclusió d'anàlegs d'ATP o ADP, que poden alterar l'estructura obtinguda.

Més encara, la consideració d'aquestes estructures no aporta grans canvis en l'estudi posterior, donat que totes les conformacions resoltes fins al moment tenen una estructura del domini motor, la part més pesada del cap de miosina, molt similar. Únicament el coll del cap de miosina, que inclou el domini de 20kDa de la MHC i les dues cadenes lleugeres ELC i RLC, canvien substancialment de disposició. En conseqüència, donada la limitada resolució de les nostres dades (ca. 2.8 nm), les diferències en la projecció axial de massa que provoca l'elecció d'altres conformacions diferents a les dues escollides són, probablement, menors, i no han d'afectar les conclusions més bàsiques de l'estudi, fet pel qual seran negligides.

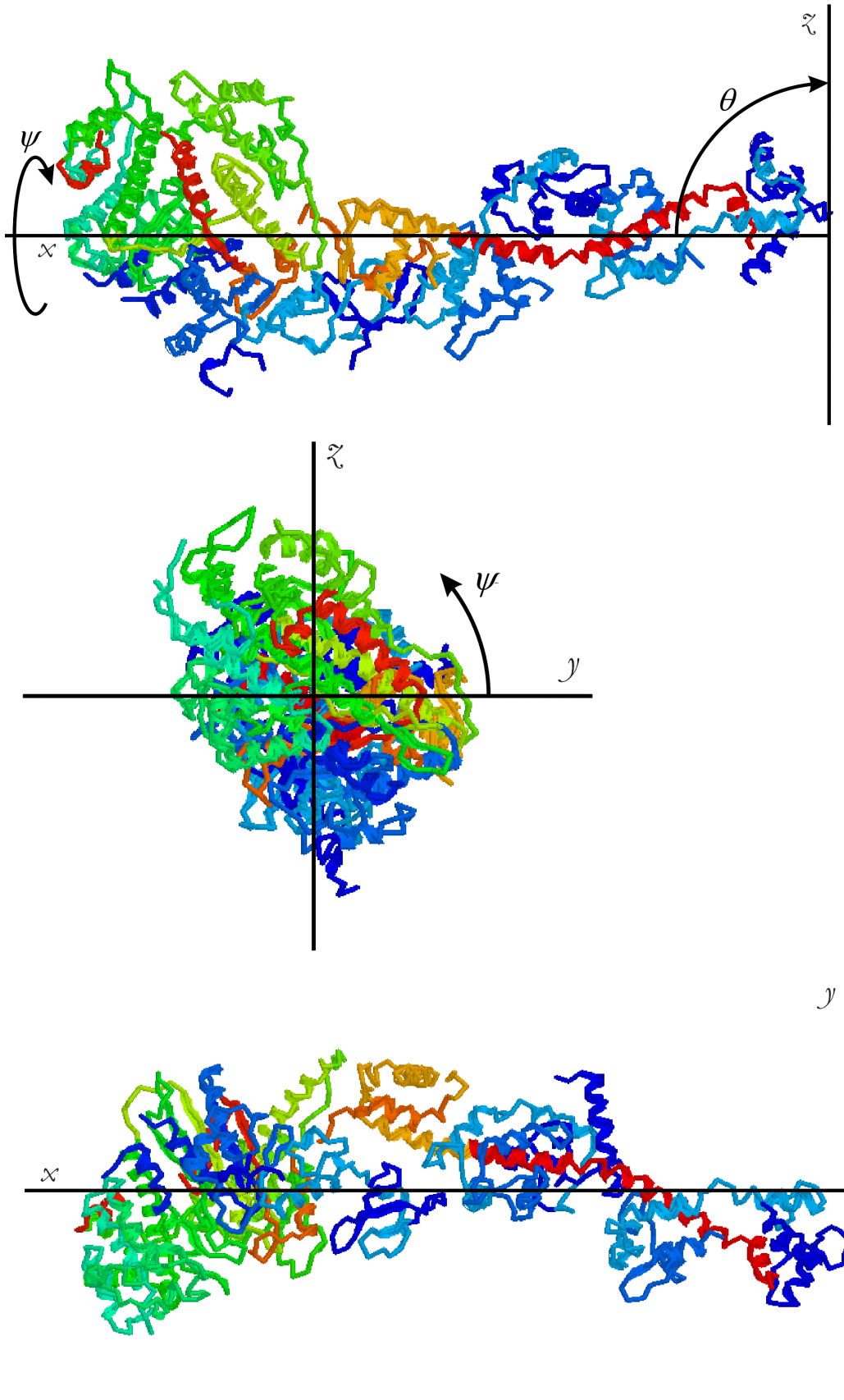


**Figura 9.1.** Alineament de les estructures 2MYS i 1B7T respecte del domini motor, que se superposa en les dues estructures. L'estructura 2MYS és orientada segons la figura 8.4 (a dalt) i, per tant, és vista frontalment. El domini motor manté la mateixa estructura en les dues estructures cristal·logràfiques, mentre que les cues estan rotades respecte d'un punt proper al pont SH1-SH2 (aminoàcids CYS697-CYS707, subdomini *converter*). L'alineament és realitzat amb el programa Swiss Protein Viewer [Guex i Peitsch, 1996]. Aquesta figura i les següents estan preparades amb el programa de gràfics molecular Rasmol [Sayle i Milner-White, 1995; Martz i Finlayson, 2000].

### 9.1.2. *Eixos, angles de rotació i orientació de l'estructura 1B7T*

Com ha quedat establert a l'anterior secció, s'utilitzaran dues estructures cristal·logràfiques del cap de miosina, 2MYS i 1B7T, per ajustar el mapa axial de densitat electrònica en l'estat de descans.

Per a la orientació inicial en descans de la primera d'aquestes, la 2MYS, s'utilitzarà la mateixa convenció en els eixos i angles de rotació que s'ha emprat prèviament en contracció isomètrica (vegeu la secció 8.2.1). L'orientació del parell de caps de miosina, per tant, està determinada per dos angles polars  $q$ , dos angles de rotació intrínseca  $\gamma$  (o de *spin*) i la distància  $d$  entre els dos caps.



**Figura 9.2.** Definició de l'orientació inicial de l'estructura cristal·logràfica 1B7T [Houdusse *et al.*, 1999] del cap de miosina, a partir de les quals es defineixen els angles  $\psi$  i  $\theta$ . (a *dalt*) Visió lateral del cap de miosina, (a *mig*) visió frontal, (a *baix*) visió zenital.

Quant a l'orientació inicial de l'estructura 1B7T, aquesta no es pot alinear amb l'estructura 2MYS malgrat que presenten una homologia estructural remarcable del domini motor, donat que l'extrem de la cua del cap de miosina està lligat a l'esquelet del filament gruixut i, per tant, ha de ser considerat un punt fix. L'alineament dels dominis motors de les dues estructures cristal·logràfiques suposaria assumir un origen diferent de rotacions, fet que no faria possible la comparació de les orientacions resultats de les estructures (figura 9.1).

Amb aquesta consideració, el procediment seguit per alinear convencionalment l'estructura cristal·logràfica 1B7T és anàleg a l'utilitzat en la primera estructura (vegeu la secció 8.2.1). En primer lloc, s'orienta l'eix major del cap de miosina sobre l'eix  $x$ , de manera que es minimitza la desviació estàndard dels a-C respecte d'aquest eix (figura 9.2). Una vegada orientat d'aquesta manera, es rota el cap de miosina fins que la diferència de distàncies dels aminoàcids homòlegs de les dues estructures cristal·logràfiques és mínima. Finalment, el cap es trasllada en la direcció de l'eix  $x$  fins que l'aminoàcid de coordenada  $x$  més negativa, és a dir, el situat més a l'extrem de la cua, se situa sobre l'eix  $z$ .

Un cop establert el conveni de l'orientació inicial del cap de miosina, i considerant que l'origen de coordenades és un punt fix, qualsevol orientació arbitrària del cap queda definit igualment pels mateixos dos angles que definien l'orientació en l'estructura anterior. D'una banda, l'angle de rotació intrínseca  $\gamma$ , o angle de *spin*, especifica la rotació del cap sobre el seu eix major (l'eix  $x$ ). D'altra banda, l'angle polar  $q$  defineix la inclinació del cap respecte de la perpendicular del filament prim (l'eix  $z$ ). Igualment a l'estructura 2MYS, qualsevol moviment de l'estructura 1B7T es realitzarà aplicant, primerament, una rotació sobre l'eix  $x$  (rotació sobre  $\gamma$ ) i, posteriorment, una rotació sobre l'eix  $z$  (rotació sobre  $q$ ).

## 9.2. Orientació mitjana dels caps de miosina amb l'ús dels ordres 3M i 6M

La diferència fonamental entre els dos estats musculars, a efectes de la síntesi de Fourier que realitzem, és la diferent longitud de la *cel·la elemental*. Mentre que en contracció isomètrica la periodicitat  $C$  és 14.55 nm (l'espaiat de la reflexió 3M, la primera considerada), en l'estat de descans la periodicitat és tres vegades més gran, ca. 43 nm (l'espaiat de la reflexió 1M) a causa de les alteracions de la simetria helicoidal. Així, la cel·la elemental en contracció isomètrica conté solament 2 caps de miosina, mentre que la cel·la elemental de l'estat de descans involucra 6 caps de miosina (3 parells).

En aquesta secció es troba l'orientació dels caps de miosina en l'estat de descans que resulta de dues simplificacions d'aquesta complexa cel·la elemental. En primer lloc, es considerarà únicament la mitjana de tres parells de caps de miosina, que es realitza fent la síntesi de Fourier dels ordres meridionals múltiples de tres, és a dir, dels ordres permesos. D'aquesta manera, apareixen únicament 2 caps de miosina en la cel·la elemental, anàlogament a la situació en contracció isomètrica.

En segon lloc, s'utilitzarà únicament, de tots els ordres permesos, les reflexions 3M i 6M. Aquests dos ordres tenen l'avantatge que poden ser modelats incloent solament la periodicitat de la miosina sense contribucions d'altres proteïnes (vegeu el capítol 6). El següent ordre de difracció permès, la reflexió 9M, no s'inclou a la síntesi de Fourier, donat que la modelització d'aquesta involucra diferents periodicitats (vegeu la secció

6.3.2. A més, la reflexió 9M és molt més dèbil que la 3M i la 6M i, per tant, l'efecte que té sobre la densitat electrònica és menor. Aquest darrer argument és igualment vàlid per a la reflexió 12M (vegeu la secció 4.2.2).

D'altra banda, en no haver considerat els ordres 9M i 12M, la inclusió a la síntesi de Fourier de l'ordre 15M, malgrat ser més intens que aquests, és arriscada. Així doncs, únicament els ordres 3M i 6M seran utilitzats inicialment a la síntesi de Fourier, de la qual s'extraurà la densitat axial de massa.

### 9.2.1. *El mapa de densitat electrònica amb l'ús dels ordres 3M i 6M*

Amb aquestes simplificacions, es realitza la síntesi de Fourier únicament amb les fases i els mòduls dels ordres 3M i 6M (taula 9.1). Les fases utilitzades són les extretes a partir de l'aproximació teòrica ideal, i tenen un origen tal que la reflexió 3M té fase 0 o  $p$  (vegeu la secció 6.2). Per la seva banda, els mòduls utilitzats són els extreps a la secció 7.3.

Amb únicament 2 ordres de difracció considerats a la síntesi de Fourier, la incertesa en  $p$  amb què s'extreuen les fases del factor d'estructura provoca que hi hagi 4 combinacions de fases ( $2^2$ ). D'aquestes 4 combinacions, es consideren solament les combinacions en què l'opció de la reflexió 3M és  $p$  per tal de situar el parell de caps de miosina al centre de la cel·la elemental. Evidentment, qualsevol combinació de fases en la qual l'opció de la reflexió 3M sigui 0 és equivalent a una altra combinació on l'opció de la fase de la 3M és  $p$ , afegint una translació igual a mitja cel·la elemental.

**Taula 9.1.** Fases i mòduls de les reflexions considerades en estat de descans, extreps de l'aproximació teòrica ideal (vegeu els capítols 6 i 7, respectivament). La indeterminació en  $p$  de les fases provoca que, per a cada ordre, siguin possibles dues opcions, anomenades opció 0 (la més negativa entre  $-180^\circ$  i  $180^\circ$ ) i opció  $p$ , que resulta de l'addició de  $180^\circ$  a les anteriors.

| Reflexió | $F_l$ | $f_l$   |           |
|----------|-------|---------|-----------|
| $M$      | [nm]  | [deg]   |           |
|          |       | opció 0 | opció $p$ |
| 3M       | 1     | 0       | 180       |
| 6M       | 0.565 | 25      | -155      |

Feta aquesta consideració, solament hi ha 2 combinacions de fases possibles,  $(p, p)$  i  $(p, 0)$ , de les quals solament la primera pot respondre a la situació real en el múscul. Efectivament, la segona combinació, la  $(p, 0)$ , presenta un lòbul molt pronunciat i un segon lòbul molt més dèbil relativament separat del primer (figura 9.3). Donat que els dos caps tenen la mateixa massa, el lòbul més dèbil només pot ser causat per una petita part d'un sol cap de miosina, que s'ha de disposar paral·lelament al filament per tal de



poder contribuir, juntament amb la totalitat de l'altre cap, al lòbul principal. La configuració que resulta d'aquest primer cap de miosina és excessivament paral·lela a l'esquelet del filament gruixut i, per tant, la combinació  $(p, 0)$  ha de ser descartada.

Així doncs, únicament la combinació  $(p, p)$  és compatible amb una projecció axial d'un parell de caps de miosina. Aquesta combinació, contràriament a la combinació anterior, presenta dos lòbuls d'intensitat similar, de tal manera que la projecció axial és aproximadament simètrica, fet que podria indicar que els dos caps tenen configuracions similars.



**Figura 9.3.** Densitats axials de massa de les dues combinacions possibles de fases que permet la síntesi de Fourier de les reflexions 3M i 6M en l'estat de descans. Només la combinació  $(p, p)$  permet una interpretació raonable de densitat axial d'un parell de caps de miosina. Compareu aquesta figura amb el seu equivalent en contracció isomètrica (figura 8.3), on els dos lòbuls són més asimètrics.

### 9.2.2. Orientació de l'estructura cristal·logràfica 2MYS a la densitat electrònica

Refinem el coneixement de la disposició dels caps de miosina en l'estat de descans amb l'ajustament de l'orientació de les estructures cristal·logràfiques al mapa axial de densitat electrònica que acabem d'obtenir. L'ajustament ha de permetre la variació dels cinc paràmetres que la determinen en un rang molt ampli que, per les mateixes raons estereomètriques que en contracció isomètrica (vegeu la secció 8.3.1), és de ca.  $\pm 75^\circ$  pels angles polars i de ca. 7 nm per la distància  $d$ . De tota manera, igualment a la situació en contracció isomètrica, aquests són uns marges molt amples, que no aporta una limitació pràctica en l'ajustament.

L'ajustament de l'orientació del parell de caps de miosina al mapa axial de densitat electrònica obtingut a partir dels ordres 3M i 6M és molt més indeterminada que l'obtinguda anteriorment en contracció isomètrica. Hi ha dues causes principals d'aquesta indeterminació.

D'una banda, únicament els ordres 3M i 6M s'han inclòs a la síntesi de Fourier i, per tant, la resolució és més reduïda (7.2 nm). La densitat axial a aquesta resolució no és sensible a característiques de la densitat electrònica més petites d'aquest valor. D'altra banda, la major semblança dels dos lòbuls de la densitat axial de massa permet que l'ajustin més configuracions dels dos caps, donat que la característica forma oblonga del cap de miosina no es veu explícitament mostrada a la projecció axial.

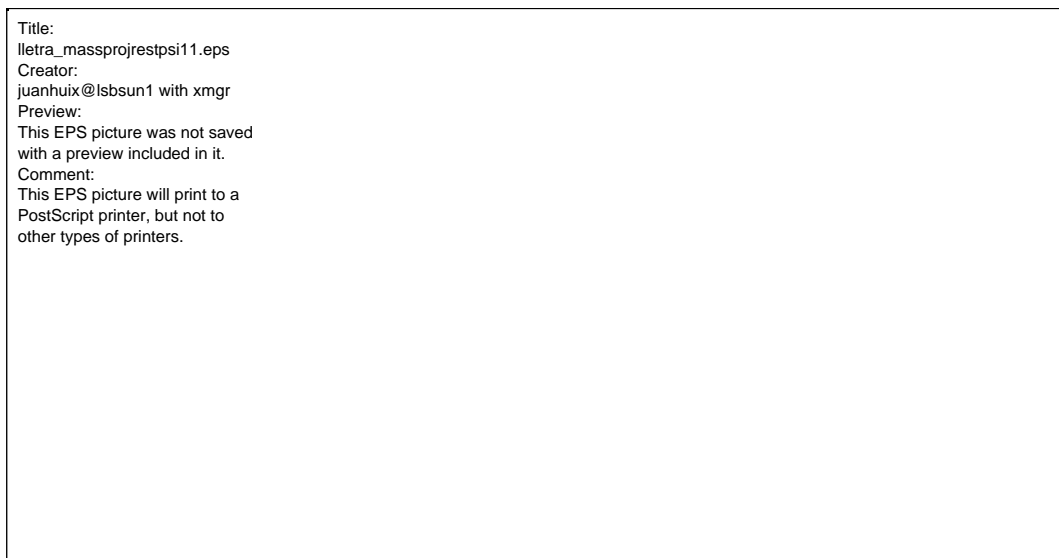
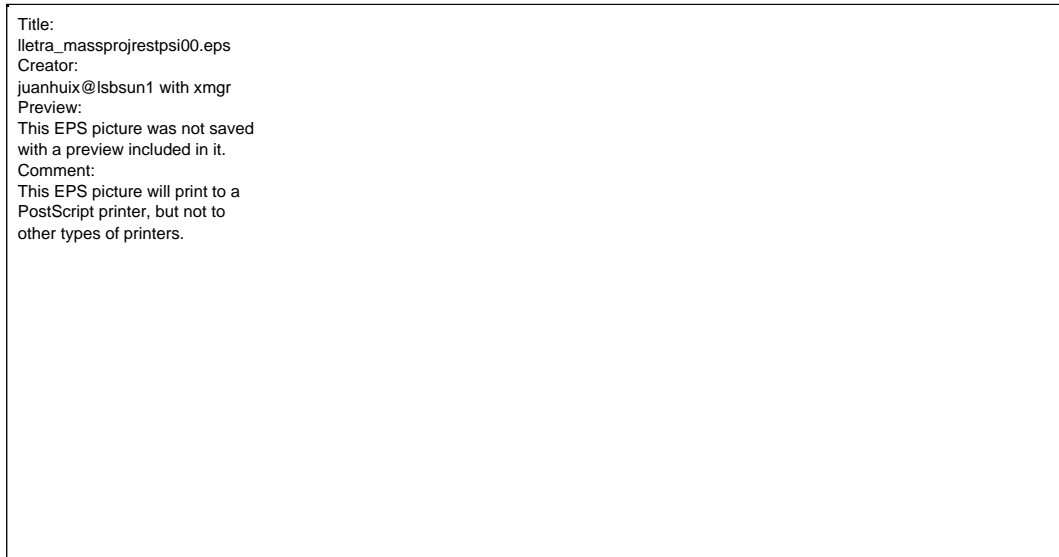
A la figura 9.4 es mostren els ajustaments de les configuracions dels caps de miosina més fidels a la densitat axial de massa. A la taula 9.2 es mostren els paràmetres, així com el residual  $R$ , calculat amb l'expressió 3.4. Les configuracions A i B de la figura 9.4 s'obtenen alineant els dos caps en la mateixa orientació respecte de l'angle de *spin*  $y$ , amb un angle proper als  $0^\circ$  i als  $180^\circ$ , respectivament. Les configuracions C i D de la mateixa figura s'obtenen amb una orientació oposada de l'angle  $y$  dels dos caps. Quan el valor de  $y$  és proper a  $0^\circ$  i  $180^\circ$ , la projecció axial del cap de miosina dona l'aparença que el coll del cap de miosina és paral·lel a l'eix major. Aquesta observació és rellevant en la discussió del capítol següent.

Per altra banda, la configuració E de la figura 9.4 mostra els caps en una posició quasi-antisimètrica i amb una aparença oblonga molt diferent als anteriors ajustaments. En aquest cas el coll del cap de miosina no és paral·lel.

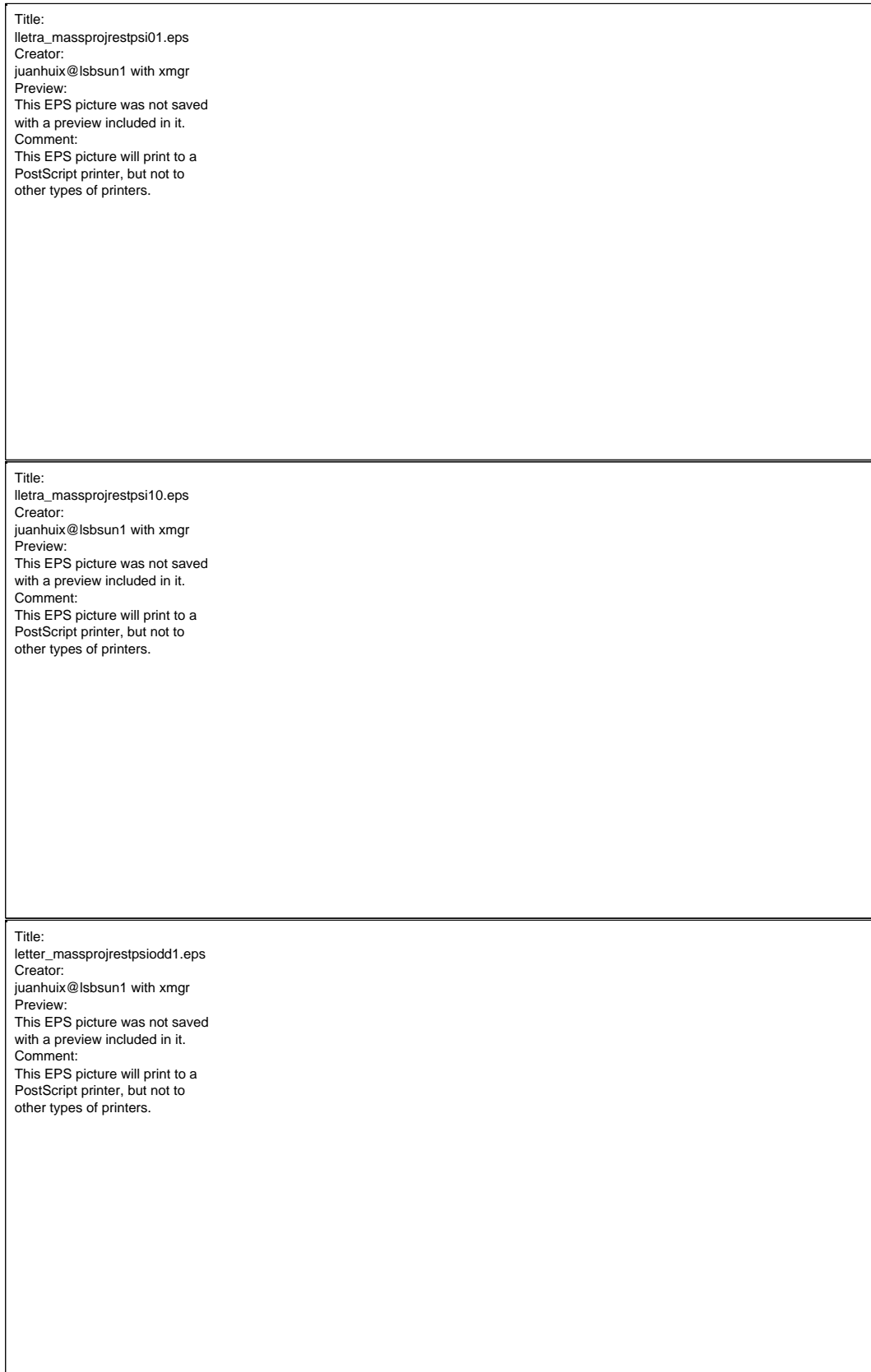
Les cinc configuracions presentades a la figura 9.4 no són les úniques, hi ha d'altres possibles que, malgrat que tenen un residual  $R$  lleugerament més gran, poden ser igualment possibles a la resolució del mapa axial de densitat electrònica.

**Taula 9.2.** Exemples d'orientacions dels dos caps de miosina (estructura cristal·lina 2MYS, sense nucleòtid) que optimitzen l'ajustament del mapa de densitat electrònica (figura 9.4). La indeterminació dels paràmetres azimuthals  $y_i$ , causats per la baixa resolució del mapa de densitat electrònica, provoca que l'optimització no sigui única. La definició de l'orientació inicial dels dos caps es dona a la figura 9.2. El cap 1 és considerat el més proper a l'origen de la cel·la elemental.

| Estructura<br>2MYS | cap de miosina 1 |                | cap de miosina 2 |                | $d$<br>[nm] | $R$<br>[%] |
|--------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|-------------|------------|
|                    | $q_1$<br>[deg]   | $y_1$<br>[deg] | $q_2$<br>[deg]   | $y_2$<br>[deg] |             |            |
| A                  | -18              | -9             | 6                | 11             | 1.4         | 3.1        |
| B                  | -19              | 171            | 6                | -164           | 1.3         | 3.3        |
| C                  | -19              | -12            | 8                | -166           | 1.1         | 2.4        |
| D                  | -19              | 172            | 5                | 11             | 1.4         | 3.5        |
| E                  | -20              | -50            | 10               | 110            | 0.2         | 3.2        |



**Figura 9.4.** A-E: (*Esquerra*) Projectió de massa bidimensional d'un parell de caps de miosina (estructura cristal·logràfica 2MYS) que, després d'una segona projecció sobre l'eix  $z$ , genera la projecció de massa mostrada en línia contínua en el requadre de la dreta. Els valors dels paràmetres d'aquesta projecció estan llistats a la taula 9.2. Es mostren únicament les cadenes polipèptides dels dos parells de caps amb les dues cadenes lleugeres ELC i RLC. El cap més inclinat és definit com cap 1, i el més inclinat és el cap 2. (*Dreta*) En cercles, mapa de densitat electrònica construït amb la combinació de fases  $(p, p)$ . Aquest mapa és el mateix que el mostrat en la figura 9.3 (requadre esquerre), i és l'únic amb el qual es pot aconseguir un ajustament satisfactori de la projecció de masses de dos caps de miosina (línia contínua).



(Figura 9.4 cont.) A i B: Projecció de massa aconseguida amb valors similars de l'angle de *spin* y (ca.  $0^\circ$  per A, ca.  $180^\circ$  per B). C i D: Projecció de massa aconseguida amb valors dels angles de *spin* dels dos caps oposats  $180^\circ$ . E: Projecció amb els angles de *spin* dels dos caps de miosina oposats  $180^\circ$ , tals que fan aparèixer la forma oblonga dels caps en la projecció bidimensional. Cal remarcar que en totes les projeccions la forma del cap de miosina és la mateixa.

### 9.2.3. Orientació de l'estructura cristal·logràfica 1B7T a la densitat electrònica

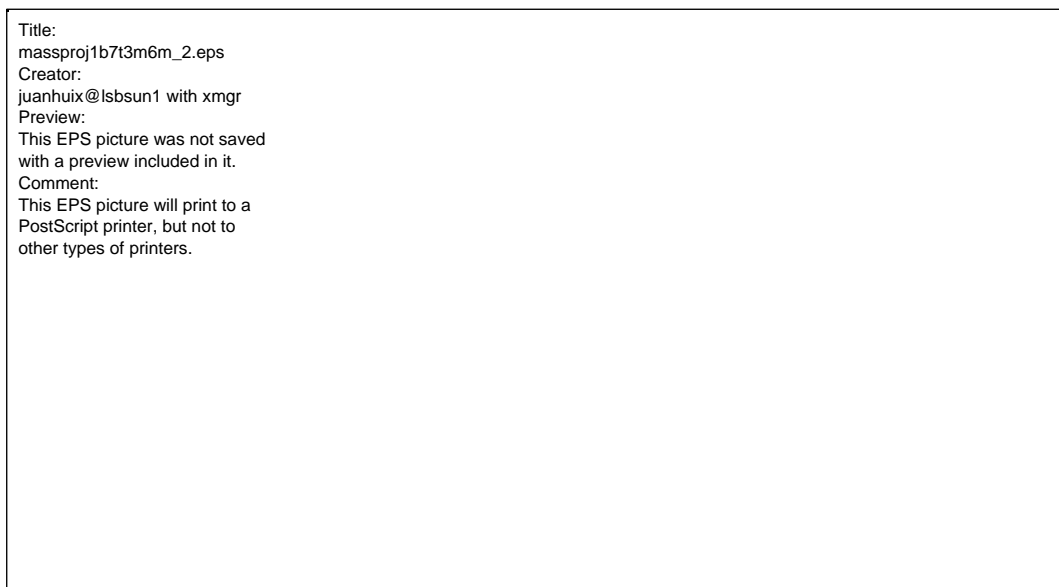
L'ajustament de l'orientació de les estructures cristal·logràfica 1B7T al mapa axial de densitat electrònica en l'estat de descans es realitza de la mateixa manera que en el cas anterior, amb l'estructura 2MYS (vegeu la secció 9.3.2). Els resultats de l'ajustament són lleugerament millors i més ben definits que en l'anterior cas. S'han trobat dues possibles orientacions del parell de caps de miosina que ajusten correctament el mapa de densitat electrònica (paràmetres a la taula 9.3, projecció axial de massa a la figura 9.5).

Els dos ajustaments tenen un residual  $R$  similar, al voltant de 1.5% que és sensiblement millor que els obtinguts amb l'anterior estructura (taula 9.2), encara que aquesta bondat podria estar influenciada per la poca resolució de la densitat axial electrònica  $r(z)$  considerada. Un aspecte remarcable és el fet que no és possible d'ajustar el mapa de densitat electrònica amb algun dels dos angles (polar o de *spin*) iguals. Per tant, el moviment que permetria passar de la posició d'un cap a la posició de l'altre cap implica les dues rotacions de què són capaços.

Els dos ajustaments aconseguits presenten uns angles sensiblement diferents i, per tant, no podem concloure de manera inequívoca l'orientació mitjana dels caps de miosina en l'estat de descans. De tota manera, és destacable que, en ambdós casos, la diferència entre els angles polars és de  $6^\circ$ , mentre que entre els angles de *spin* la diferència és de  $26^\circ$ . Aquests valors seran calculats novament utilitzant totes les reflexions fins a la 9M, incloses les reflexions prohibides (vegeu la secció 9.5).

**Taula 9.3.** Orientació dels dos caps de miosina (estructura cristal·lina 1B7T, amb MgADP) que optimitza l'ajustament del mapa de densitat electrònica (figura 9.5). La definició de l'orientació inicial dels dos caps es dona a la figura 9.2. El cap 1 és definit com el més proper a l'origen de la cel·la elemental.

| Estructura           | cap de miosina 1 |                | cap de miosina 2 |                | $d$<br>[nm] | $R$<br>[%] |
|----------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|-------------|------------|
|                      | $q_1$<br>[deg]   | $y_1$<br>[deg] | $q_2$<br>[deg]   | $y_2$<br>[deg] |             |            |
| (figura 9.5, a dalt) | -11              | -45            | -4               | -69            | 3.9         | 1.44       |
| (figura 9.5, a baix) | -19.5            | -125           | -14.3            | -152           | 4.3         | 1.77       |



**Figura 9.5.** (*Esquerra*) Orientació axial d'un parell de caps de miosina (estructura 1B7T) que genera la projecció de massa mostrada en línia contínua en el requadre de la dreta. Els valors dels paràmetres d'aquesta projecció estan llistats a la taula 9.3. El cap més inclinat és definit com cap 1, i el més inclinat és el cap 2. (*Dreta*) En cercles, mapa de densitat electrònica construït amb la combinació de fases ( $p, p$ ). Aquest mapa és el mateix que el mostrat en la figura 9.3 (requadre esquerre), i és l'únic amb el qual es pot aconseguir un ajustament satisfactori de la projecció de masses de dos caps de miosina (línia contínua).

### 9.2.4. Conclusions dels ajustaments

L'ajustament de la densitat electrònica simplificada a les estructures cristal·logràfiques del cap de miosina 1MYS (sense nucleòtid) i 1B7T (amb MgADP) han aportat dades bàsiques però fonamentals de la disposició dels caps de miosina en l'estat de descans.

La primera conclusió dels resultats de l'ajustament amb l'estructura cristal·logràfica 2MYS és que no és possible determinar unívocament la projecció del parell de caps de miosina únicament amb els ordres 3M i 6M.

La causa principal d'aquesta incertesa és l'angle de *spin*  $\gamma$ , que no pot ser determinat, tant en valor absolut per a cada cap de miosina, com el valor relatiu entre els caps. La distància  $d$  entre els extrems dels colls dels dos caps també té una gran variació, si bé en cap cas supera la distància entre els màxims dels lòbuls, ca. 5 nm, i, de fet, a la als ajustaments de residual  $R$  més baix és sempre inferior a 1.5 nm. Respecte de l'estructura 1B7T, l'incertesa és molt menor, donat que solament s'han trobat dues minimitzacions, que difereixen essencialment en el valor de l'angle de *spin*.

En segon lloc, i matisant la primera conclusió, cal remarcar que els angles polars són molt semblants en tots els ajustaments, independentment dels angles de *spin*  $\gamma$  i de la distància  $d$ . Amb l'estructura 2MYS, el valor mitjà que pren l'angle polar per als dos caps de miosina és ca.  $-19^\circ$  i ca.  $8^\circ$ . Amb l'estructura 1B7T, sigui quin sigui els valors que prenen els dos angles de *spin*, una variació d'únicament  $2^\circ$  respecte del valor òptim en l'angle polar d'un dels dos caps porta a una projecció que no ajusta en absolut la síntesi de Fourier. L'ajustament és molt sensible a l'angle polar.

En tercer lloc, s'observa que els angles polars dels dos caps de miosina són molt més semblants entre ells en l'estat de descans, que en l'estat de contracció isomètrica. De tota manera, la orientació dels dos caps no pot ser idèntica, donat que la diferència entre els angles polars respecte de la direcció perpendicular a l'eix,  $10^\circ$ , és netament superior al marge d'error.

Perquè els angles polars fossin iguals, caldria que els dos lòbuls fossin simètrics, fet que implica que les fases  $y_{3M}$  i  $y_{6M}$  del factor d'estructura de les reflexions 3M i 6M han de ser iguals o oposades en fase. Aquesta condició, però, no es pot acomplir, donat que la diferència de fase entre les dues reflexions és  $25^\circ$ , amb un marge d'error màxim de ca.  $4^\circ$ . Així doncs, l'orientació polar, si bé lleugerament, és significativament diferent entre els dos caps.

Amb aquestes consideracions, podem concloure que, malgrat que la poca resolució del mapa axial de densitat electrònica fa que el resultat no pugui ser conclouent, l'ajustament realitzat amb l'estructura 1B7T sembla més correcte (té un residual  $R$  més baix) que el realitzat amb l'estructura 2MYS. Aquesta conclusió és, de fet, esperada, atès que, en l'estat de descans, la pràctica totalitat dels caps de miosina contenen nucleòtid en un temps donat. Recordem que la primera estructura ha estat cristal·litzada amb el complex nucleòtid MgADP, mentre que la segona ho ha estat sense nucleòtid.

Finalment, cal remarcar una altra vegada que aquestes conclusions es realitzen sobre el parell de caps de miosina mitjà de la cel·la elemental de l'estat de descans, que conté tres parells. És necessari, per tant, un estudi més complet que inclogui les reflexions prohibides, que diferencien els perfils radials dels tres parells, així com la inclusió d'ordres més elevats per augmentar la resolució.

### 9.3. Densitat electrònica axial dels caps de miosina

A la secció precedent, s'ha calculat el mapa axial de densitat electrònica dels parells de caps de miosina en l'estat de descans sota unes simplificacions importants. La densitat obtinguda representa la mitjana de tres parells consecutius de caps i no té en compte, per tant, les importants distorsions que aquests presenten en descans. Malgrat això, s'han pogut extreure conclusions importants, que seran utilitzades seguidament.

La situació dels caps de miosina en descans és més complexa, amb multitud d'ordres, permesos i prohibits, que cal considerar. Calculem tot seguit el mapa axial de densitat electrònica dels parells de caps de miosina de manera general, considerant tots aquests ordres.

#### 9.3.1. La síntesi de Fourier

La determinació de la densitat electrònica axial dels caps de miosina en l'estat de descans es realitza mitjançant una síntesi de Fourier (vegeu la secció 2.1.3.2), que inclou 9 ordres de difracció, fins a la reflexió 9M (expressió 2.18),

$$\rho_z(z) = \sum_{l=1}^9 F_l \cos 2\pi z \frac{l}{C} + \phi_l \quad (9.1)$$

Amb tot, per ajustar-nos a la situació del múscul, aquesta senzilla expressió ha de ser modificada en dos aspectes. En primer terme, cal tenir present que la modelització dels perfils meridionals ha conclòs la necessitat de dues periodicitats atribuïbles a la miosina, anomenades Mio1 i Mio2 (vegeu la secció 6.3). Les dues periodicitats tenen valors molt similars de l'espaiat  $C$ , 43.05 nm i 42.83 nm, fet pel qual les podem aproximar a una sola cel·la elemental. L'error comès en una cel·la, com a màxim de 0.22 nm, és molt inferior a la resolució de la reflexió 9M, l'últim ordre de difracció considerat, de ca. 2.4 nm. A més, convé recordar que únicament hi ha prop de 16 repeticions i, per tant, al llarg d'un extrem del filament, l'error es propaga fins a 1.76 nm, encara inferior a la resolució de la reflexió 9M. En conseqüència, s'assumirà que la cel·la elemental és la mitjana de les dues periodicitats, és a dir, 42.94 nm.

En segon terme, a més de la introducció de dues periodicitats, la síntesi de Fourier ha d'incloure el mòdul del factor d'estructura real de cadascuna de les dues periodicitats,  $F_{\text{Mio1}, l}$  i  $F_{\text{Mio2}, l}$ . Aquest, en un ordre  $l$  donat, és el producte de l'amplitud  $F_l$  de difracció global de tota la línia de difracció pel pes relatiu en aquesta línia de cada periodicitat de la miosina,

$$F_{i, l} = F_l w_{i, l} \quad (9.2)$$

El primer factor, l'amplitud de difracció  $F_l$  del conjunt de totes les contribucions presents en un ordre  $l$  ha estat extret a la secció 7.2 (taula 7.1). Recordem que aquest factor inclou ja la correcció de la cristal·linitat i dels desordre angular. D'altra banda, el pes relatiu  $w_{i, l}$  que té una estructura donada en el mateix ordre ha estat trobada, juntament amb la fase del factor d'estructura, a la secció 6.3.1 (taula 6.6).



Per tant, amb totes aquestes consideracions, la síntesi de Fourier que permet trobar l'amplitud electrònica axial de les dues periodicitats dels caps de miosina, Mio1 i Mio2, és

$$\rho_z(z) = \sum_{l=1M}^{9M} F_l w_{Mio1,l} \cos 2\pi z \frac{l}{C_{Mio1,l}} + \phi_{Mio1,l} + \sum_{l=1M}^{9M} F_l w_{Mio2,l} \cos 2\pi z \frac{l}{C_{Mio2,l}} + \phi_{Mio2,l} \quad (9.3)$$

Afegim que, a aquesta síntesi de Fourier, s'ha de sumar la contribució de l'ordre zero, que és una constant que no afecta al perfil del mapa de densitat electrònica. Aquest terme serà introduït més endavant, quan discutim la condició de positivitat de la densitat electrònica (vegeu la secció 9.4.4.6).

Tots els factors de la síntesi de Fourier (expressió 9.3) han estat extrets, tant dels perfils meridionals ( $f_{i,l}$  i  $w_{i,l}$ : secció 6.3) com dels perfils radials ( $F_l$ : secció 7.2) de les línies de difracció en tots els ordres, excepte per la reflexió 1M. Els factors d'aquesta reflexió són trobats a continuació.

### 9.3.2. Determinació del mòdul i la fase de la reflexió 1M

La contribució de la reflexió 1M en la síntesi de Fourier (equació 9.3) no pot ser negligida, donat que aquesta reflexió és sensible a característiques de la densitat axial electrònica de longitud netament superior a la resolució de la síntesi de Fourier. Amb tot, l'anàlisi dels perfils meridional i radial de la reflexió 1M no és possible de manera directa, donada la dificultat i incertesa en la determinació d'aquests a partir dels diagrames de difracció obtinguts (vegeu la secció 4.2.3). Per tant, el mòdul i la fase del factor d'estructura no poden ser extrets experimentalment, de manera que han de ser trobats teòricament, aprofitant el coneixement a priori que es té de la densitat axial electrònica.

En particular, la densitat axial electrònica dels caps de miosina ha d'incloure 6 caps de miosina, de massa molecular idèntica, agrupats a parells. La cel·la elemental, per tant, inclou 3 parells, que han de ser aproximadament equidistants, per bé que no exactament, donada la presència d'ordres meridionals prohibits que delaten la lleugera irregularitat de la disposició.

Com a conseqüència d'això, la densitat axial electrònica esperada dels caps de miosina ha de consistir en 3 elements de massa, corresponents als 3 parells de caps de miosina, de perfil diferent però de massa idèntica. Aquesta condició no pot ser acomplerta en cas de no incloure la reflexió 1M, atès que, a causa de la lenta variació que té al llarg de la cel·la, aquesta reflexió té l'efecte d'augmentar la densitat en una meitat de la cel·la (i, per tant, hi inclou tot un parell) i de disminuir l'altra meitat (ídem). Si aquesta reflexió no és inclosa, les densitats dels diferents caps queda descompensada, i la massa aparent dels parells és diferent.

En incloure la reflexió 1M, si  $r_z'(z)$  és la densitat electrònica obtinguda amb els ordres 2M-9M (sense la reflexió 1M), i  $F_{i,l} w_{i,l} \cos(2\pi z/C_i + f_{i,l})$  és el terme de la

reflexió 1M de la periodicitat  $i$  en la síntesi de Fourier (expressió 9.3) els parells de caps de miosina tindran la mateixa massa quan compleixin

$$\rho_z(z) + \sum_{\substack{i = \text{Mio1,} \\ \text{Mio2}}} F_1 w_{i,1M} \cos \frac{2\pi z}{C_i} + \phi_{i,1M} dz = \text{ct.}, \quad (9.4)$$

on la regió entre  $z_0$  i  $z_0 + C/3$  abasta el rang axial d'un parell de caps de miosina. Hi ha, en principi, molts conjunts de paràmetres de la reflexió 1M que compleixen la condició 9.4 i, per tant, que assegurin que les masses moleculars dels 3 parells de caps de miosina són les mateixes. Aquest conjunt, però, és únic si suposem que els pesos relatius de les dues periodicitats dels caps de miosina,  $w_{\text{Mio1},1}$  i  $w_{\text{Mio2},1}$ , són idèntics, i que la diferència entre les fases  $f_{\text{Mio1},1}$  i  $f_{\text{Mio2},1}$  és la mitjana entre les reflexions 2M (ca. 52°) i 0M (0°). Amb aquestes restriccions, la condició 9.4 es compleix per a un sol mòdul i una sola fase (l'altra es deriva unívocament).

Convé assenyalar que els ordres superiors no inclosos en la síntesi de Fourier (a partir de la reflexió 10M) no afecten significativament els valors trobats per a la reflexió 1M, donat que el seu període és petit comparat amb la dimensió d'un parell de caps de miosina. En particular, els ordres permesos superiors no inclosos (i, per tant, la relativament intensa reflexió 15M) no afecten en absolut el conjunt de paràmetres de la reflexió 1M que compleixen la condició 9.4, atès que hi ha un nombre exacte de períodes en cada amplada  $C/3$  del parell de caps.

### 9.3.3. Mòduls i fases considerats en la síntesi de Fourier

Les fases i els mòduls del factor d'estructura dels caps de miosina utilitzats per construir la síntesi de Fourier (expressió 9.3) i trobar, d'aquesta manera, el mapa axial de densitat electrònica estan llistats a la taula 9.4. Els valors de les fases  $f_i$ , així com els pesos relatius  $w_{i,1}$  provenen del model que hem anomenat de 3+3 periodicitats (vegeu la secció 6.3), mentre que els mòduls  $F_i$  són deduïts mitjançant el perfil radial (vegeu la secció 7.2). Remarquem que la reflexió 1M no està inclosa donat que, per a aquesta reflexió, la fase i el mòdul dels anteriors models no s'apliquen i, en canvi, es troben aplicant la condició 9.4.

Cal destacar que, a diferència de l'extracció de la densitat electrònica utilitzant únicament les reflexions 3M i 6M, l'origen de les fases del factor d'estructura no és fixat amb la reflexió 3M en l'estat de descans, sinó amb la reflexió 3M l'estat de contracció isomètrica. Per assolir aquest origen s'ha imposat que la mitjana de les longituds d'interferència de les dues periodicitats dels caps de miosina (866.75 nm i 863.45 nm, taula 6.5) sigui igual a la longitud d'interferència  $L$  utilitzada en l'estat de descans (865.2 nm, taules 5.1, 5.2 i 5.3). Recordem que un canvi en  $L$  és equivalent a un desplaçament de la fase (vegeu la secció 5.3.1.1) i, per tant, imposant el mateix valor de  $L$ , l'origen de les fases es manté constant.

Aquesta convenció porta a que els dos mapes de densitat electrònica tenen el mateix origen en l'espai real. Els desplaçaments relatius entre masses són, per tant, reals (vegeu la secció 6.3.2.1), fet que permet les comparacions entre els mapes de densitat electrònica obtinguts en descans i contracció isomètrica.

**Taula 9.4.** Fases i mòduls de les reflexions 2M-9M considerades en la síntesi de Fourier, en estat de descans, per a les dues periodicitats dels caps de miosina, Mio1 i Mio2. Les amplituds  $F_{i,l}$  s'obtenen mitjançant l'expressió 9.2. La indeterminació en  $p$  de les fases provoca que, per a cada ordre, siguin possibles dues opcions, anomenades opció 0 (la més negativa entre  $-180^\circ$  i  $180^\circ$  per a la periodicitat Mio1) i opció  $p$ , que resulta de l'addició de  $180^\circ$  a les anteriors.

| Reflexió<br>$M$ | $F_{\text{Mio1},l}$ | $f_{\text{Mio1},l}$<br>[deg] |           | $F_{\text{Mio2},l}$ | $f_{\text{Mio2},l}$<br>[deg] |           |
|-----------------|---------------------|------------------------------|-----------|---------------------|------------------------------|-----------|
|                 |                     | opció 0                      | opció $p$ |                     | Opció 0                      | opció $p$ |
| 2M              | 0.038               | -135                         | 45        | 0.098               | -30                          | 150       |
| 3M              | 0.488               | -57                          | 123       | 0.512               | -54                          | 126       |
| 4M              | 0.111               | -129                         | 51        | 0.193               | 161                          | -19       |
| 5M              | 0.092               | -105                         | 75        | 0.204               | -144                         | 36        |
| 6M              | 0.310               | -95                          | 85        | 0.255               | -69                          | 25        |
| 7M              | 0.107               | -150                         | 30        | 0.088               | -125                         | 55        |
| 8M              | 0.124               | -117                         | 63        | 0.144               | -119                         | 61        |
| 9M              | 0.066               | -19                          | 161       | 0.057               | -13                          | 167       |

### 9.3.4. Criteris de determinació de la fase

L'extracció de la fase del factor d'estructura a partir dels perfils meridionals dels diferents ordres conté una incertesa en el signe que no permet distingir entre una fase  $f_l$  i la seva oposada  $f_l + p$  (vegeu la secció 5.2.3.3). Així, per a cada ordre  $l$  de difracció, la fase  $f_l$  del factor d'estructura pot prendre dos valors, que hem anomenat genèricament opció 0 i opció  $p$  (vegeu la secció 9.1.1). Qualsevol combinació d'opcions en les fases genera exactament el mateix mapa axial de densitat electrònica.

Cal puntualitzar que, d'ordre a ordre, la fase del factor d'estructura pot canviar d'opció, però, en canvi, en un mateix ordre, les dues periodicitats dels caps de miosina no poden tenir opcions diferents, atès que les fases de les diferents periodicitats d'un mateix ordre de difracció tenen una relació fixada. La presència de dues periodicitats, per tant, no afecta al nombre de combinacions possibles de fases.

Així, el nombre de combinacions depèn solament del nombre de reflexions considerades a la síntesi de Fourier (expressió 9.3) que han estat extretes a partir de la modelització del perfil meridional. Amb 8 reflexions (2M-9M) considerades a la síntesi de Fourier, el nombre total de combinacions de fases és 256 ( $2^8$ ).

El nombre de combinacions és molt més elevat que en l'estat de contracció isomètrica, on s'han considerat 4 reflexions en la síntesi de Fourier que, un cop fixat l'origen de les fases, donen un total de 8 possibles mapes de densitat electrònica (figura 8.2). La gran quantitat de possibles mapes de densitat electrònica en descans fa que calguin criteris orientadors per resoldre la determinació basats especialment en el coneixement de la composició de la cel·la elemental i de l'estructura cristal·logràfica

del cap de miosina. A continuació exposem aquests diferents criteris, llistats succintament a la taula 9.5, que permeten eliminar combinacions de fases.

**Taula 9.5.** Criteris que permeten reduir progressivament el nombre de possibles combinacions de fases del factor d'estructura, causades per la indeterminació en  $p$ , de fases del factor d'estructura. Els dos darrers criteris no fixen una sola reflexió, sinó combinacions en què intervenen diverses reflexions.

| Criteri d'elecció                              | Reflexió fixada | Nombre de combinacions restants |
|--|-----------------|---------------------------------|
| Nombre total de combinacions                   |                 | 256 ( $2^8$ )                   |
| Elecció de l'origen de fases                   | 3M              | 128 ( $2^7$ )                   |
| Forma bilobulada del parell a baixa resolució  | 6M              | 64 ( $2^6$ )                    |
| 3 parells ben definits                         | 4M o 5M         | 32 ( $2^5$ )                    |
| Comportament suau de la fase a baixa resolució | 2M              | 16 ( $2^4$ )                    |
| Forma bilobulada a alta resolució              |                 | 11                              |
| Positivitat de la densitat electrònica         |                 | 6                               |

#### 9.3.4.1. Elecció de l'origen de les fases

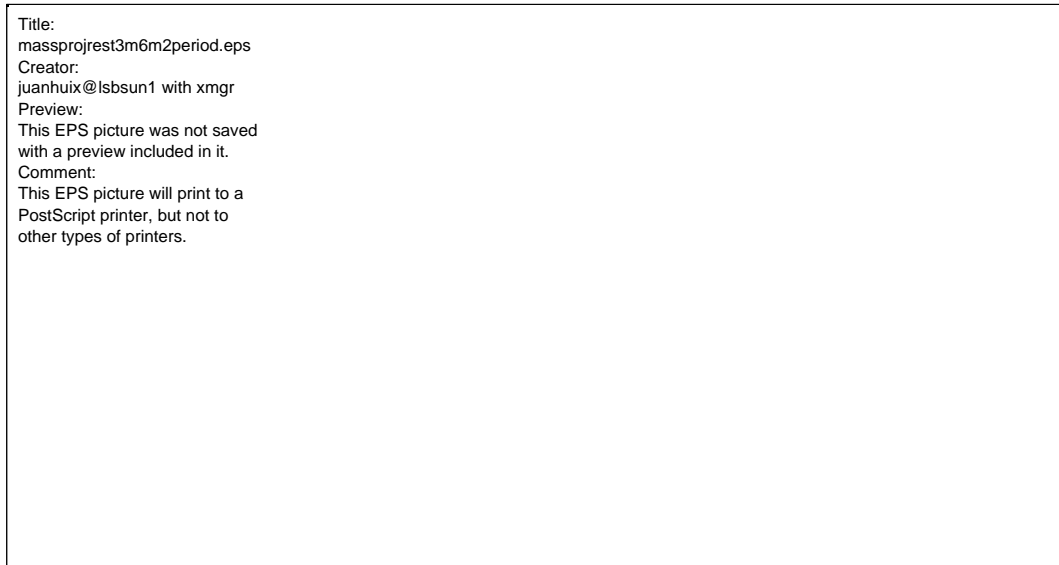
En contracció isomètrica, i en la densitat axial simplificada en l'estat de descans, s'ha suposat que la fase de la reflexió 3M és  $p$  (vegeu les seccions 5.3.1.1 i 6.2, respectivament). En canvi, en aquesta extracció del mapa axial de densitat electrònica en descans, com s'ha dit prèviament, l'origen de les fases fixada per a l'estat de contracció es manté, fet que porta a la pèrdua de la fase 0 o  $p$  per a la reflexió 3M.

Independentment de la convenció utilitzada, però, l'elecció de l'origen de les fases permet fixar la fase una reflexió, amb respecte a la qual les altres fases queden igualment fixades. Així, el nombre de combinacions de les fases queda reduït a la meitat.

#### 9.3.4.2. Forma bilobulada del parell de caps de miosina

Les fases de la taula 9.4, extretes amb el model anomenat de 3+3 periodicitats, han de ser compatibles amb les fases extretes amb els models més senzills que ajusten únicament les reflexions permeses 3M i 6M (vegeu la secció 6.2). Per tant, la densitat axial electrònica del model simplificat ha de ser similar a la densitat axial que inclou les fases de les reflexions 3M i 6M del model 3+3 (vegeu la secció 9.3, figura 9.3).

Tal com mostra la figura 9.6, la densitat electrònica que s'extreu quan s'inclouen les fases de les reflexions 3M i 6M del model de 3+3 periodicitats és similar al model ideal. Així, per les mateixes consideracions que en la secció 9.3.1, l'opció de la fase de la 6M ha de ser idèntica a la de la 3M i, per tant, aquesta primera queda fixada. El nombre de combinacions es torna a reduir en la meitat.



**Figura 9.6.** Mapes axials de densitats electrònica de les dues combinacions possibles de fases que permet la síntesi de Fourier de les reflexions 3M i 6M en l'estat de descans, utilitzant les fases i mòduls extrets del model complet de 3+3 periodicitats (taula 9.5). Només la combinació  $(p, p)$  permet una interpretació raonable de densitat axial d'un parell de caps de miosina. El resultat és molt similar a l'obtingut amb el model simplificat (vegeu la secció 9.3, figura 9.3). A fi de facilitar la comparació, s'ha fet un desplaçament de l'origen de fases equivalent a  $z = 2$  nm.

### 9.3.4.3. Els tres parells de caps de la cel·la han d'estar ben definits

Les reflexions 4M i 5M tenen fases similars, fet que porta a que les seves contribucions se sumin de manera constructiva o destructiva segons si tenen o no la mateixa opció en la fase. Es comprova que quan aquestes dues reflexions tenen opcions diferents (sigui 0 per la 4M i  $p$  per la 5M, o viceversa) les projeccions dels tres parells de caps no tenen mínims clars entre ells i no queden ben definits. Així doncs, pel fet de lligar les opcions de fase de dues reflexions, el nombre de combinacions es torna a reduir a la meitat.

### 9.3.4.4. Comportament suau de la fase a baixa resolució

Suposem igualment que el comportament de la fase a baixa resolució és suau sense canvis bruscos i, per tant, la fase de la reflexió 2M és propera a la de la 3M. Per tant, assumim que aquestes dues reflexions tenen la mateixa opció de fase, és a dir,  $p$ . De tota manera, a causa de la poca amplitud de difracció de la reflexió 2M, el mapa de densitat electrònica que resulta de les dues opcions és molt similar. Amb aquesta suposició, que lliga les opcions de la fase de les reflexions 2M i 3M, el nombre de fases torna a disminuir per la meitat.

### 9.3.4.5. Forma coherent dels parells de caps de miosina

Amb les consideracions anteriors, el nombre de possibles combinacions de fases és 16. D'aquestes, cal eliminar les que originen un mapa axial de densitat electrònica no compatible amb la presència de dos caps de miosina cada ca. 14.3 nm. Així, es descarten els mapes que presenten més de dos pics en cada terç de cel·la, o aquells en què un parell de caps apareix ajagut sobre l'esquelet del filament. Dels 16 possibles,

per aquestes raons se'n descarten 5, i, per tant, queden un total de 11 possibles combinacions de fases.

### 9.3.4.6. La positivitat de l'estructura

Finalment, l'últim criteri utilitzat és la positivitat del mapa de densitat electrònica, que indica que la densitat electrònica dels caps de miosina, tant en descans com en contracció isomètrica, ha de ser positiva en tot punt de la cel·la elemental considerada. Dit d'altra manera, el criteri estableix que la línia basal del mapa axial, és a dir, el mínim de la densitat electrònica a la cel·la, ha de ser positiva. Aquesta línia basal és determinada, entre els altres ordres superiors coneguts de la síntesi de Fourier, per l'amplitud de difracció a l'origen de les dues periodicitats dels caps de miosina,  $F_{\text{Mio},0}$  que, segons l'expressió 2.3, és la massa total de la cel·la elemental, és a dir,

$$F_{\text{Mio},0} = \int_z^{z+C} \rho_z(z) dz \quad (9.6)$$

La massa total dels caps de miosina en una cel·la no és coneguda a priori, donat que el diagrama de difracció no inclou l'origen. No obstant això, la massa total dels caps de miosina al múscul en l'estat de descans ha de ser la mateixa que en contracció isomètrica i, per tant,  $F_{\text{Mio},0}$  ha de tenir el mateix valor en els dos estats. Per tant, s'aplicarà el valor de l'amplitud de difracció a l'origen en contracció isomètrica, que ja ha estat calculada assumint que la línia basal és nul·la el mínim de la densitat electrònica és nul, en el càlcul en l'estat de descans.

De tota manera, l'aplicació a l'estat no és tant directa, atès que cal fer una correcció dels mòduls de les diferents contribucions de la síntesi de Fourier. Aquestes han estat normalitzades independentment per a cada ordre prenent arbitràriament la reflexió 3M, la més intensa, com la unitat. S'ha de relacionar, per tant, el mòdul d'aquesta reflexió dels dos estats mitjançant el model que permet trobar els perfils radials i les amplituds de les línies de difracció corregides pel grau de cristal·linitat (vegeu el capítol 7). En definitiva, l'amplitud de difracció a l'origen  $(F_{\text{Mio},0})_{\text{descans}}$  dels caps de miosina en l'estat de descans és,

$$(F_{\text{Mio},0})_{\text{descans}} = (F_{\text{Mio},0})_{\text{contr. isom.}} \frac{(F_{\text{Model},3M})_{\text{descans}}}{(F_{\text{Model},3M})_{\text{contr. isom.}}} \quad (9.7)$$

L'amplitud de difracció a l'origen dels caps en contracció isomètrica,  $(F_{\text{Mio},0})_{\text{contr. isom.}}$ , és calculada a la secció 8.1.2, mentre que el quocient entre els valors del mòdul de la reflexió 3M, en descans i en contracció isomètrica, s'obté aplicant l'expressió 7.26 amb els paràmetres trobats per als dos estats a les seccions 7.2 i 7.3, respectivament. Amb aquestes operacions, el quocient pren un valor de 1.60.

S'ha aplicat la condició de positivitat als 11 possibles mapes axials de densitat electrònica que han complert els criteris precedents. D'aquests, 5 mapes tenen una línia basal significativament negativa i, per tant, són negligits (taula 9.6).

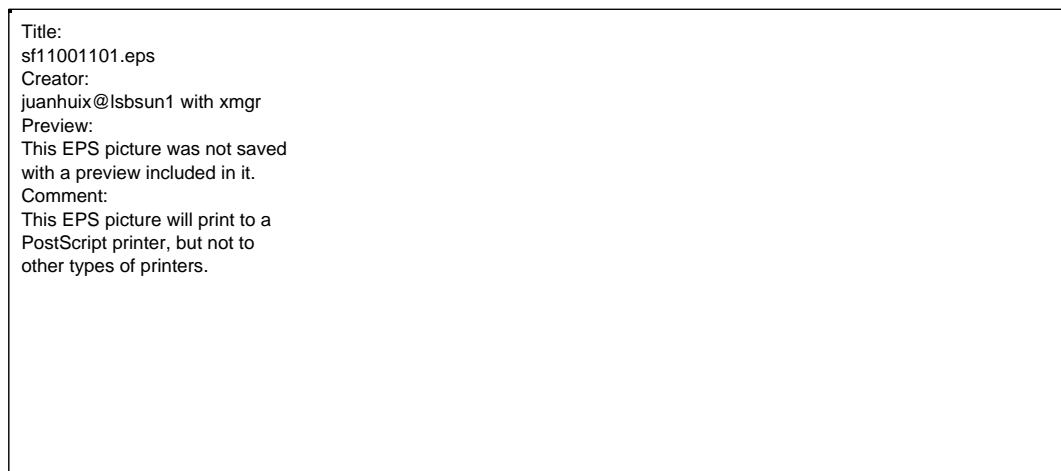
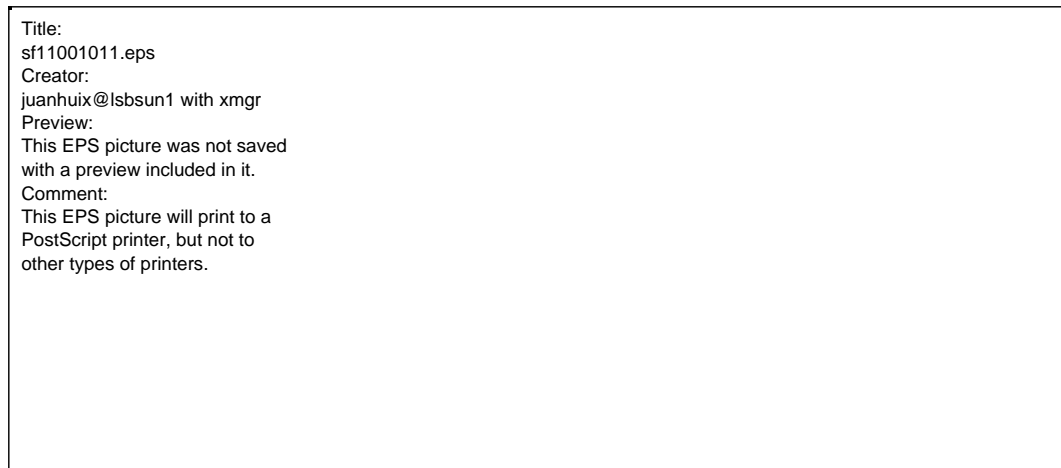
### 9.3.5. Possibles mapes axials de densitat electrònica

Després d'aplicar els diversos criteris per resoldre la indeterminació de la fase exposats a la secció anterior, el nombre de possibles mapes axials de densitat electrònica es redueix sensiblement, de 256 inicials a 6. Aquests 6 mapes, juntament amb la combinació de fases a què corresponen, es mostren a la figura 9.7. A la taula 9.6 es mostren el mòdul i la fase del factor d'estructura de la reflexió 1M que s'han utilitzat en cada possible mapa de densitat electrònica, així com l'altura de la línia basal d'aquests.

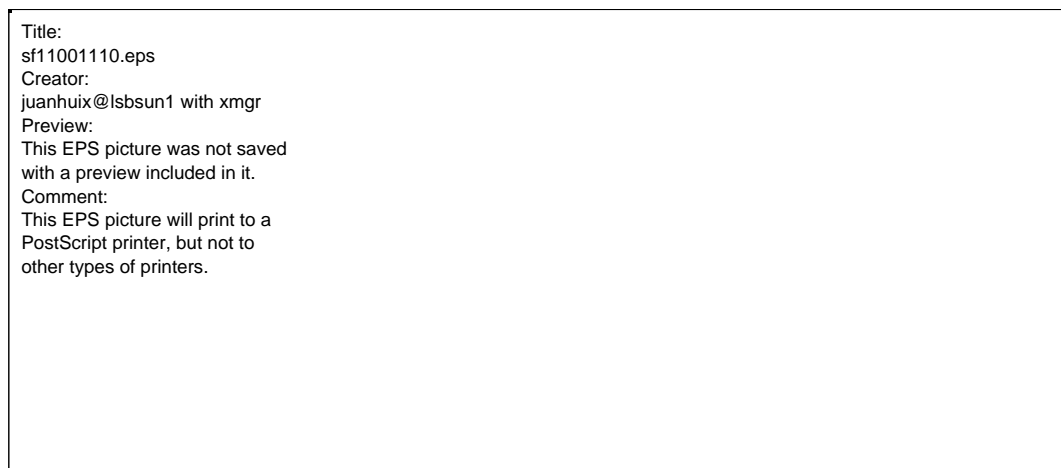
Els sis possibles mapes de densitat electrònica tenen un seguit de característiques comunes que convé destacar. Com és d'esperar per la introducció dels ordres prohibits a la síntesi de Fourier, els tres parells de caps de miosina en una mateixa cel·la, que anomenarem *A*, *B* i *C* a partir de l'origen de la cel·la, tenen una configuració sensiblement diferent. Les diferències entre parells inclouen l'ample del parell (de ca. 12 nm a ca. 16 nm) i, especialment, la separació entre màxims (de ca. 15 nm a ca. 35 nm). Els parells de caps, per tant, clarament no tenen el mateix estat dins de la mateixa cel·la elemental.

La configuració dels parells de caps de miosina té un tret comú característic: en totes les cel·les hi ha dos parells de caps amb un perfil relativament similar, mentre que el perfil del tercer parell és notablement diferent. Aquesta apreciació és conforme a les observacions realitzades en microscòpia electrònica, que aprecien una diferència entre les bandes atribuïbles als caps de miosina [Craig, 1977; Squire, 1981]. Més endavant analitzem les implicacions d'aquesta observació.

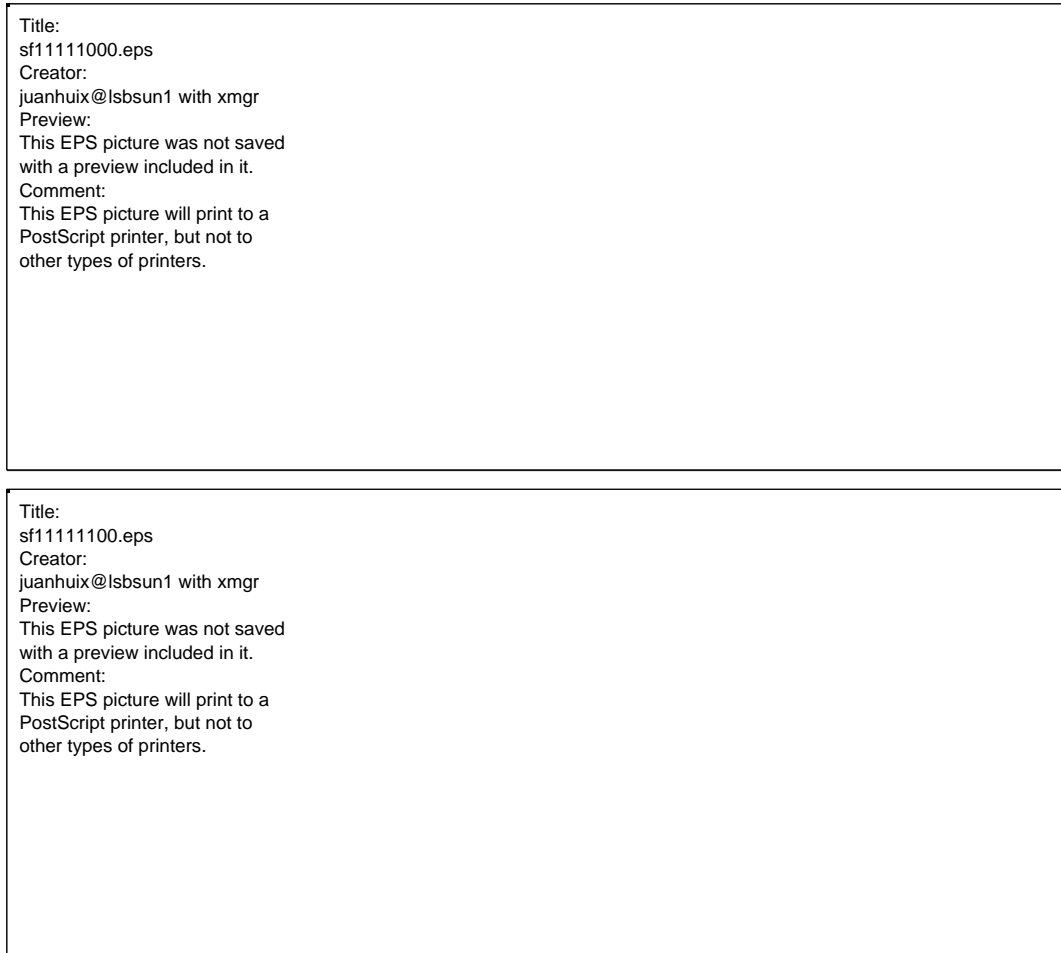
Title:  
sf11001000.eps  
Creator:  
juanhui@lsbsun1 with xmgr  
Preview:  
This EPS picture was not saved  
with a preview included in it.  
Comment:  
This EPS picture will print to a  
PostScript printer, but not to  
other types of printers.



**Figura 9.7.** Mapes axials de densitat electrònica de les combinacions de fases que compleixen tots els criteris enunciats a la secció 9.4.4. A dalt i a l'esquerra de cada mapa, entre parèntesis, hi ha indicada la combinació de fases que li correspon. El primer terme del parèntesi és l'opció de la reflexió 2M, el segon terme és la de la reflexió 3M, i així successivament fins la 9M.







**Figura 9.7. (cont.)** Mapes axials de densitat electrònica de les combinacions de fases que compleixen tots els criteris enunciats a la secció 9.4.4.

**Taula 9.6.** Valors de la línia basal i del mòdul i la fase de la reflexió 1M de les combinacions de fases que compleixen els criteris enunciats a les seccions de 9.4.4.1 a 9.4.4.5. El mòdul i la fase de la reflexió 1M compleixen la condició 9.4. Les 5 últimes combinacions de fases tenen una línia basal significativament negativa i, per tant, són negligides al no complir la condició de positivitats.

| Combinació de fases<br>(2M, ..., 9M) | Reflexió 1M |       | Línia basal |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|
|                                      | Fase [deg]  | Mòdul |             |
| $(p, p, 0, 0, p, 0, 0, 0)$           | 87.1        | 0.060 | 0.09        |
| $(p, p, 0, 0, p, 0, p, p)$           | 105.2       | 0.052 | 0.10        |
| $(p, p, 0, 0, p, p, 0, p)$           | 66.9        | 0.048 | 0.01        |
| $(p, p, 0, 0, p, p, p, 0)$           | 87.2        | 0.035 | -0.02       |
| $(p, p, p, p, p, 0, 0, 0)$           | -111.5      | 0.070 | 0.00        |
| $(p, p, p, p, p, p, 0, 0)$           | -97.0       | 0.081 | 0.10        |
| $(p, p, 0, 0, p, 0, 0, p)^*$         | 87.1        | 0.060 | -0.12       |
| $(p, p, 0, 0, p, p, p, p)^*$         | 87.2        | 0.035 | -0.09       |

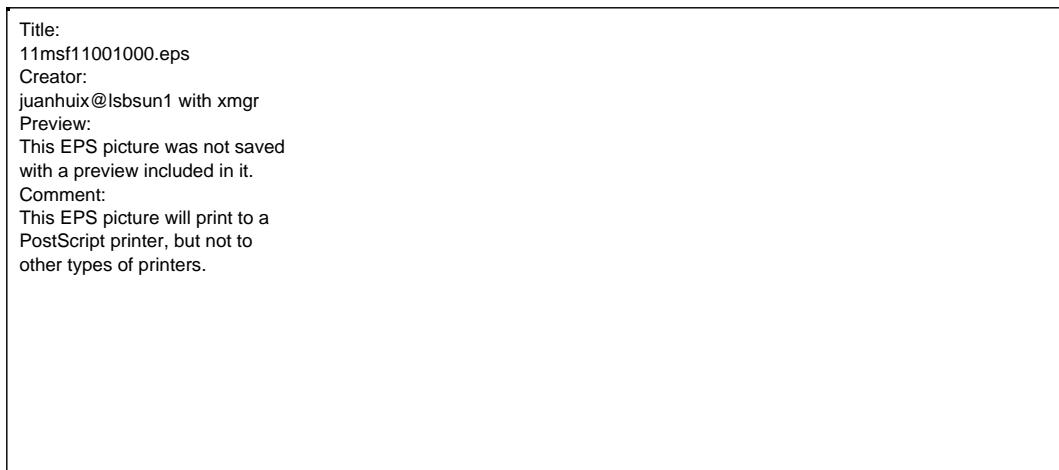
|                              |        |       |       |
|------------------------------|--------|-------|-------|
| $(p, p, p, p, p, p, 0, p)^*$ | -97.0  | 0.081 | -0.13 |
| $(p, p, p, p, p, p, p, 0)^*$ | -106.7 | 0.094 | -0.18 |
| $(p, p, p, p, p, p, p, p)^*$ | -106.7 | 0.094 | -0.38 |

(\*) Combinacions de fases no mostrades a la figura 9.7.

### 9.3.6. L'efecte de la reflexió 11M en el mapa axial

La reflexió 11M ha estat negligida fins ara del càlcul del mapa axial de densitat electrònica en l'estat de descans, a conseqüència de la incertesa en l'origen d'aquesta i de no incloure tampoc la reflexió 10M al mapa axial, que deixa sense sentit la inclusió d'ordres superiors. La reflexió pot ser originada pel primer ordre de la repetició de ca. 4 nm dels subdominis de la titina FNIII i Ig (vegeu la secció 1.2.4), en lloc de la repetició dels caps de miosina i, per tant, en aquest cas, no ha de ser inclosa en la síntesi de Fourier que dona lloc al mapa de densitat electrònica. De tota manera, fins ara, a la literatura no hi ha hagut cap evidència de l'origen de la reflexió.

Una prova que pot indicar l'origen de la reflexió 11M és el mapa axial de densitat electrònica que resulta d'introduir la contribució d'aquesta reflexió a la síntesi de Fourier (expressió 9.3). A causa del gran mòdul d'aquesta reflexió, cap dels mapes axial que s'obtenen d'aquesta manera pot ser identificat com la projecció dels parells de caps de miosina. A tall d'exemple, la figura 9.8 mostra el mapa axial corresponent a la combinació de fases  $(p, p, 0, 0, p, 0, 0, 0)$  després d'haver afegit la contribució de la reflexió 11M. Aquest nou mapa axial és molt diferent a l'originat amb solament les 9 primeres reflexions (figura 9.6). Així doncs, en resum, atès el comportament del mapa axial de la densitat electrònica, aquesta reflexió no prové dels caps de miosina, sinó de la titina.



**Figura 9.8.** Mapa axial de densitat electrònica de la combinació de fases  $(p, p, 0, 0, p, 0, 0, 0)$  amb la reflexió 11M (amb mòdul i fase extrets de la taula 6.6, fase opció 0). Aquest mapa de densitat electrònica és clarament no compatible amb la projecció de 3 parells de caps de miosina.

## 9.4. Ajustament de l'estructura cristal·logràfica 1B7T al mapa axial

### 9.4.1. Resultat de l'ajustament

El pas següent a la determinació del mapa axial de densitat electrònica en descans és l'ajustament d'aquest a l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina. Anteriorment, en el cas simplificat que utilitzava les reflexions 3M i 6M (vegeu la secció 9.3), s'han utilitzat dues estructures cristal·logràfiques per l'ajustament, 2MYS i 1B7T, de les quals la segona aconsegueix un millor ajustament. A més, aquesta estructura està cristal·litzada amb MgADP, un anàleg d'ADP·Pi, que és l'estat del nucleòtid en què es troba la major part del temps del cicle d'ATP. En canvi, l'altra estructura, la 2MYS, ajusta amb menys precisió el mapa axial de densitat electrònica simplificat en descans i, a més, està cristal·litzat sense nucleòtid, un estat molt inestable del cap de miosina en descans.

Per aquestes raons, realitzem a continuació l'ajustament del mapa axial de densitat electrònica solament amb l'estructura cristal·logràfica 1B7T. La cel·la elemental serà, per tant, constituïda per 6 d'aquestes estructures agrupades a parells, cadascun dels quals és definit a partir de 5 paràmetres: dos angles polars, dos angles de *spin* i una distància entre cues dels caps (vegeu la secció 8.2.2).

Com als anteriors ajustaments, considerem que els paràmetres poden variar segons els criteris enunciats a la secció 8.3.1 i, a més hi afegim una nova condició per limitar la gran quantitat de solucions complexes a què es pot arribar a causa de la presència de 3 parells.

La nova condició suposa que la diferència dels angles de rotació intrínseca dels dos caps no pot ser molt gran. En cas que així fos, donat que en algun moment del cicle d'ATP han de passar per la mateixa conformació amb un enllaç estereoespecífic amb el filament prim, els canvis conformacionals d'un estat a l'altre serien molt grans, fet que faria ineficient el cicle. A més, cal tenir en compte que els punts d'enllaç del cap de miosina amb l'actina estan situats en *loops* molt mòbils que poden fer, per tant, innecessària una gran mobilitat de tot el cap. Tant els angles polars com la distància entre cues tenen poca variació entre caps, donat que queden ben determinats per l'ajustament, de manera que aquesta nova condició intervé únicament en els angles de rotació intrínseca. Arbitràriament, es considerarà que els angles de *spin* de tots els caps d'una mateixa cel·la no han de diferir en més de 120°, independentment del parell on estiguin situats. Aquesta elecció cobreix dos terços de totes les possibles orientacions relatives dels caps respecte a aquest angle.

Amb aquestes restriccions, dels 6 mapes axials de densitat electrònica, solament un d'ells, el corresponent a la combinació  $(p, p, 0, 0, p, p, p, 0)$ , no permet un ajustament coherent. En el altres mapes axials s'ha trobat una solució, mostrada a la figura 9.9, els paràmetres de les quals estan llistats a la taula 9.7.

**Taula 9.7.** Ajustaments òptims dels cinc mapes axials de densitat electrònica de la figura 9.8 aconseguits amb l'estructura cristal·logràfica 1B7T. Cal remarcar que en la combinació de fases  $(p, p, 0, 0, p, p, p, 0)$  no ha estat possible trobar cap ajustament. A cada parell de caps, el cap de miosina 1, caracteritzat amb els paràmetres  $i$ , és definit com el més proper a l'origen de la cel·la elemental. El

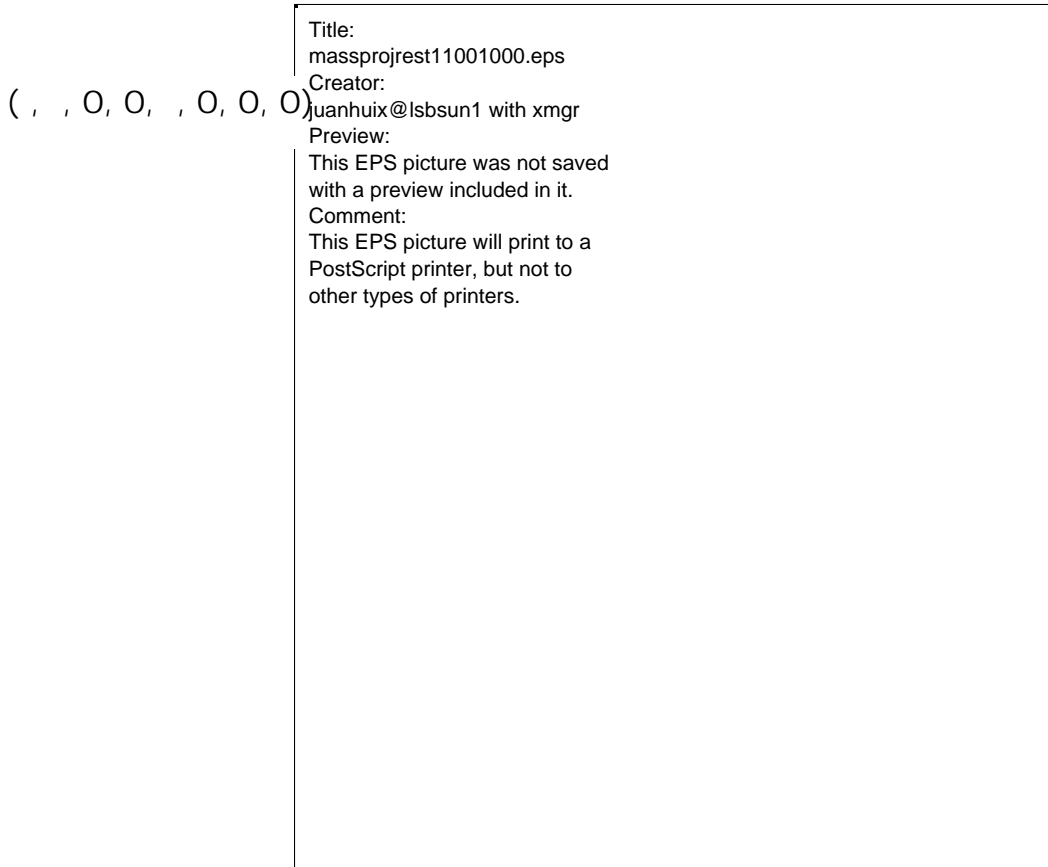
cap de miosina 2, caracteritzat amb els paràmetres  $q_i$  i  $y_i$ , apareix orientat sistemàticament més perpendicular al filament que el cap 1.

| Combinació de fases<br>(2M, ..., 9M) | Parell de caps A |       | Parell de caps B |       | Parell de caps C |       | R [%] |
|--------------------------------------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|-------|
|                                      | $q_1$            | $y_1$ | $q_1$            | $y_1$ | $q_1$            | $y_1$ |       |
|                                      | $q_2$            | $y_2$ | $q_2$            | $y_2$ | $q_2$            | $y_2$ |       |
|                                      | $d$              |       | $d$              |       | $d$              |       |       |
| (p, p, 0, 0, p, 0, 0, 0)             | -18.6            | -174  | -17              | -160  | -14              | -149  | 2.7   |
|                                      | -17              | -195  | -10              | -152  | -9               | -102  |       |
|                                      | 21.9             |       | 43.9             |       | -35.1            |       |       |
| (p, p, 0, 0, p, 0, p, p)             | -20              | -149  | -18              | -135  | -14              | -159  | 3.2   |
|                                      | -16.1            | -146  | -10              | -89   | -12.3            | -124  |       |
|                                      | 52               |       | 40.6             |       | 43.1             |       |       |
| (p, p, 0, 0, p, p, 0, p)             | -16              | -145  | -22.1            | -150  | -14.1            | -155  | 3.4   |
|                                      | -10              | -119  | -15.9            | -161  | -14              | -121  |       |
|                                      | 46               |       | 45.1             |       | 46               |       |       |
| (p, p, p, p, p, 0, 0, 0)             | -13.9            | -174  | -17              | -172  | -18              | -140  | 3.9   |
|                                      | -12              | -115  | -12.1            | -150  | -12.5            | -111  |       |
|                                      | 47               |       | 43.2             |       | 50.1             |       |       |
| (p, p, p, p, p, p, 0, 0)             | -13              | -160  | -29              | -159  | -17.7            | -153  | 4.3   |
|                                      | 0.1              | -176  | -23.2            | -178  | -9.9             | -126  |       |
|                                      | 25               |       | 32.1             |       | 45.3             |       |       |

### 9.4.2. Conclusions de l'ajustament

L'ajustament de l'estructura cristal·logràfica dels caps de miosina s'ha aconseguit en 5 dels 6 possibles mapes de densitat electrònica que restaven després d'aplicar tots els criteris que acoten la indeterminació en p de la fase (vegeu la secció 9.4.4). El mapa axial corresponent a la combinació de fases (p, p, 0, p, p, 0) no permet un ajustament correcte per dos motius. D'una banda, en aquest mapa, les valls que separen els mapes axials de dos parells de caps consecutius tenen una gran diferència de densitats electròniques. D'altra banda, aquest mapa axial és l'únic dels 6 possibles en què hi ha un parell amb un perfil aproximadament especular als altres dos caps de la cel·la elemental, de manera que les orientacions dels parells són molt diferents i surten dels rangs establerts.

Així doncs, analitzem seguidament les característiques comunes dels altres 5 ajustaments, mostrats a la figura 9.9, respecte dels diferents paràmetres que els determinen: els angles polar i de *spin*, i la distància entre les cues dels caps.



**Figura 9.9.** (*Esquerra*) Projectió de massa bidimensional de tres parells de caps de miosina (estructura cristal·logràfica 2MYS) que, després d'una segona projectió sobre l'eix  $z$ , genera la projectió de massa mostrada en línia contínua en el requadre de la dreta. Els valors dels paràmetres d'aquesta projectió estan llistats a la taula 9.7. Els parells de caps són anomenats  $A$ ,  $B$  i  $C$  a partir de l'origen de la cel·la. Dins de cada parell, el cap més inclinat és definit com cap 1 (i, per tant, orientat amb els angles  $q_1$  i  $y_1$ ), i el més inclinat és el cap 2 (d'angles  $q_2$  i  $y_2$ ). (*Dreta*) En cercles, mapa de densitat electrònica construït amb la combinació de fases corresponent. El mapa axial és el mateix que el mostrat a la figura 9.7.

( , , 0, 0, , 0, , )

Title:  
massprojrest11001011.eps  
Creator:  
juanhuiX@lsbsun1 with xmgr  
Preview:  
This EPS picture was not saved  
with a preview included in it.  
Comment:  
This EPS picture will print to a  
PostScript printer, but not to  
other types of printers.

( , , 0, 0, , , 0, , )

Title:  
massprojrest11001101.eps  
Creator:  
juanhuiX@lsbsun1 with xmgr  
Preview:  
This EPS picture was not saved  
with a preview included in it.  
Comment:  
This EPS picture will print to a  
PostScript printer, but not to  
other types of printers.

**Figura 9.9. (cont.)** Dos possibles mapes axials de densitat electrònica (*dreta*), i orientació més probable dels caps de miosina (estructura 1B7I, *esquerra*).

( , , , , , 0, 0, 0)

Title:  
massprojrest11111000.eps  
Creator:  
juanhuiX@lsbsun1 with xmgr  
Preview:  
This EPS picture was not saved  
with a preview included in it.  
Comment:  
This EPS picture will print to a  
PostScript printer, but not to  
other types of printers.

( , , , , , , 0, 0)

Title:  
massprojrest11111100.eps  
Creator:  
juanhuiX@lsbsun1 with xmgr  
Preview:  
This EPS picture was not saved  
with a preview included in it.  
Comment:  
This EPS picture will print to a  
PostScript printer, but not to  
other types of printers.

**Figura 9.9. (cont.)** Dos possibles mapes axial de densitat electrònica (*dreta*), i orientació més probable dels caps de miosina (estructura 1B7T, *esquerra*).

### 9.4.2.1. L'orientació polar dels dos caps d'un parell és diferent

Els dos caps de miosina en tots els parells tenen un orientació polar  $q$  diferent, tal com s'havia suggerit anteriorment amb l'ajustament de la densitat axial que utilitzava solament les reflexions 3M i 6M. Així, a cada parell, hi ha sempre un cap de miosina amb una orientació més paral·lela al filament gruixut (l'anomenat cap de miosina 1) i un altre amb una orientació més perpendicular (cap de miosina 2).

L'angle mitjà de totes les orientacions polars dels caps de miosina 1 de tots els parells, mostrades a la taula 9.7, és de  $\langle q_1 \rangle = -11^\circ$ , mentre que, pels caps 2, l'orientació és de  $\langle q_2 \rangle = -17^\circ$  (figura 9.10). La diferència entre angles polars ( $q_2 - q_1$ ) va de  $-4^\circ$  als  $-11^\circ$  segons el mapa axial, amb una mitjana de  $-6^\circ$ . Aquesta diferència és petita, però és sistemàtica en el mateix sentit per a tots els parells ajustats de tots els mapes axials.

Finalment, convé recordar que el signe negatiu indica que els caps estan orientats cap al centre de la cel·la elemental, del qual no podem saber si s'orienta cap al centre del filament (la línia M) o cap a l'extrem. El signe, per tant, és solament convencional, i únicament amb l'ajut d'altres experiments podem determinar el sentit de l'orientació dels caps de miosina respecte del filament.

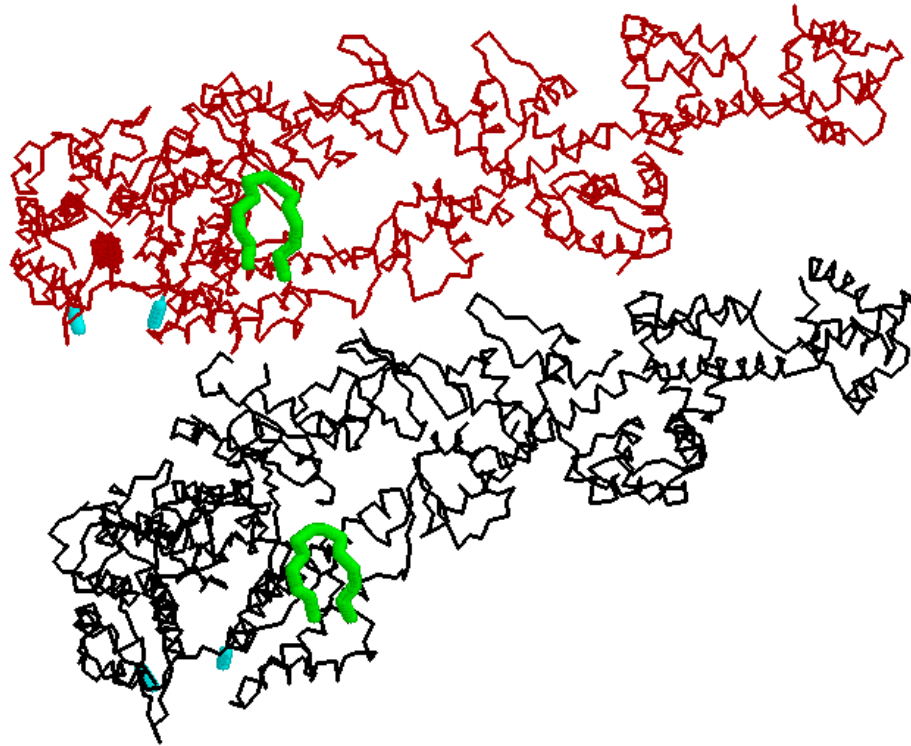
### 9.4.2.2. La rotació intrínseca relativa és relativament petita

Respecte de la rotació intrínseca, o de *spin*, dels caps de miosina, la variació és més gran, i hi ha una major incertesa a causa de la menor sensibilitat que tenen els mapes axials a aquest angle.

El punt més remarcable és el fet que, per a tots els possibles mapes axials i per a tots els caps de tots els parells en aquests mapes, els angles de rotació intrínseca varien entre  $-90^\circ$  i  $-190^\circ$ , amb poca variació entre els caps de miosina 1 i els caps 2. Així, l'angle de *spin* mitjà dels caps de miosina 1 de tots els parells és de  $\langle y_1 \rangle = -159^\circ$ , mentre que pels caps de miosina 2 l'orientació és de  $\langle y_2 \rangle = -138^\circ$ . Aquestes orientacions dels tots els mapes són molt similars a les trobades al segon ajustament del cas simplificat, que inclou solament les reflexions 3M i 6M (figura 9.5, a baix, taula 9.3).

La diferència entre els angles de rotació intrínseca ( $y_2 - y_1$ ) va de  $20^\circ$  als  $-60^\circ$ , amb una mitjana de  $-21^\circ$ , una variació molt menor a la permesa per les condicions inicials (de  $-120^\circ$  a  $+120^\circ$ , vegeu la secció 8.3.1). Aquesta petita diferència porta a que els possibles punts d'enllaç de la miosina amb l'actina, els anomenats *loops* P i M (Díaz-Baños *et al.*, 1996; Rayment *et al.*, 1993a; Schroder *et al.*, 1993), se situïn aproximadament a la mateixa orientació (figura 9.10).





**Figura 9.10.** Orientació mitjana de tots els parells de caps i de tots els ajustaments. Els paràmetres són  $\langle q_1 \rangle = -11^\circ$ ,  $\langle q_2 \rangle = -17^\circ$ ,  $\langle y_1 \rangle = -159^\circ$  i  $\langle y_2 \rangle = -138^\circ$ ,  $\langle d \rangle = 4.1$  nm. El filament gruixut s'orienta verticalment. El cap 2 (en vermell) és orientat més perpendicularment al cap 1 (en negre) respecte del filament. D'altra banda, la similitud dels angles de *spin* porta a que els llops P (en verd) i M (en blau cel, tallat perquè l'estructura no ha estat resolta cristal·logràficament) es situïn aproximadament a les mateixes posicions relatives.

## 9.5. Conclusions

En aquest capítol s'ha determinat els possibles mapes axials de densitat electrònica dels caps de miosina en l'estat de descans, a partir de les fases i els mòduls del factor d'estructura, obtinguts al capítol 6 i 7, respectivament. La incertesa en  $p$  de la fase, el nombre i la complexitat de les reflexions dels caps de miosina porta a determinar el mapa axial dels caps en dos passos, útils en les successives conclusions.

El primer pas consisteix en considerar únicament les reflexions 3M i 6M (vegeu la secció 9.3). La modelització d'aquestes dues reflexions és senzilla, donat que es poden modelar correctament suposant solament una disposició ideal dels caps de miosina sense desordre, i sense incloure altres periodicitats del sarcòmer que puguin complicar l'ajustament. A més, en aquestes dues reflexions s'obté un mapa axial de densitat electrònica simplificat, que correspon a la disposició mitjana dels caps de miosina. La cel·la elemental, per tant, es redueix a un sol parell de caps de miosina, anàlogament a la situació en contracció isomètrica.

El segon pas en la deducció de la densitat axial dels caps de miosina en descans consisteix en considerar tots els ordres de difracció fins a la màxima resolució possible, en el nostre cas fins a la reflexió 9M (vegeu la secció 9.4 i 9.5). Les reflexions d'ordre superior no han estat considerades a causa de la impossibilitat d'extreure la fase

(reflexió 10M) o de determinar-ne l'origen (reflexió 11M). D'altra banda, la contribució de la reflexió 1M es calcula a partir de la igualtat entre les masses axials dels tres parells de caps de la cel·la elemental.

En aquest segon pas, a resultes de considerar també la presència dels ordres prohibits, s'obté la densitat axial exacta, que té una cel·la elemental en l'estat de descans que inclou 3 parells de caps de miosina. No obstant això, en incloure solament les periodicitats 3M i 6M, s'obté un mapa axial de densitat electrònica simplificat, que correspon a la disposició mitjana dels caps de miosina. La cel·la elemental, per tant, es redueix a un sol parell de caps de miosina, anàlogament a la situació en contracció isomètrica.

L'ajustament de l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina als dos mapes axials de densitat electrònica (simplificat i complet) dona una informació addicional i més quantitativa sobre l'orientació dels caps en descans. De manera inversa, la densitat axial pot establir un criteri sobre quina de les conformacions cristal·litzades del cap de miosina és la present en descans.

D'aquest procés, primerament la deducció de la densitat axial de la densitat electrònica en dos passos i, segonament, l'ajustament a aquesta de les estructures cristal·logràfiques, s'extreuen conclusions rellevants sobre la orientació dels caps de miosina en l'estat de descans que tot seguit resumim.

### ***9.5.1. Els dos caps a cada parell tenen orientacions similars***

El mapa axial simplificat en l'estat de descans que resulta del primer pas de l'anàlisi és clarament diferent a l'extret en contracció isomètrica, donat que conté dos lòbuls molt més simètrics (figures 9.3 dreta i 8.3 dreta, respectivament). Aquesta és una conseqüència inevitable de la diferència de fases de ca.  $74^\circ$  entre les reflexions 3M i 6M en descans (vegeu el capítol 6), molt més propera a  $90^\circ$  que en contracció isomètrica.

No obstant això, la diferència de fases indica que, encara que més lleugerament, els dos lòbuls del mapa axial de densitat electrònica en descans són diferents. Això pot indicar que els caps continuen tenint, de mitjana, orientacions diferents en descans. Aquesta afirmació és confirmada per l'ajustament a la densitat axial de les estructures cristal·logràfiques considerades (2MYS i 1B7T).

### ***9.5.2. L'estructura 1B7T és adequada per descriure el mapa axial en descans***

En la literatura hi ha reportades diverses estructures cristal·logràfiques dels caps de miosina cristal·litzades amb anàlegs del nucleòtid. D'aquestes estructures, s'han considerat dues: l'estructura 1B7T, cristal·litzada amb el complex nucleòtid MgADP, i l'estructura 2MYS, cristal·litzada sense nucleòtid i ja utilitzada en contracció isomètrica.

Les dues estructures són orientades per ajustar el mapa simplificat, obtingut amb les reflexions 3M i 6M, per tal de decidir quina d'elles s'ha d'utilitzar en l'ajustament a la densitat electrònica més completa que considera tots els ordres. L'ajustament de l'estructura 2MYS, malgrat és correcte, queda indeterminat donat que l'angle de *spin*

pot prendre pràcticament qualsevol valor. D'altra banda, l'ajustament a l'estructura 1B7T és clarament millor, i presenta solament dues possibilitats, que difereixen essencialment en els valors dels angles de *spin*.

Donat que, en l'estat de descans, el cap de miosina presenta nucleòtid en la major part del cicle d'ATP, cal suposar que la segona estructura, la 1B7T, és més adequada per ajustar el mapa axial de densitat electrònica. Això, juntament amb el millor ajustament del mapa axial simplificat amb l'estructura 1B7T porta a considerar aquesta com la més correcta per a l'ajustament a la densitat axial completa.

### 9.5.3. *No és possible determinar unívocament el mapa axial*

Les fases del factor d'estructura s'han pogut determinar anteriorment, excepte una indeterminació en  $p$ . Aquesta incertesa porta a que hi hagin, en principi, 256 possibles mapes axials de densitat electrònica complets. Les diverses possibilitats han de ser avaluades mitjançant diferents restriccions imposades en l'espai real, basats essencialment en el perfil que ha de complir la densitat axial pel fet de provenir de tres parells de caps de miosina. Finalment es troben 5 possibles mapes de densitat electrònica que són compatibles amb l'ajustament mitjançant l'estructura cristal·logràfica 1B7T (l'ajustament amb l'estructura 2MYS s'ha descartat a causa dels pitjors ajustaments). Per tant, la determinació unívoca del mapa axial de densitat electrònica no ha estat possible.

### 9.5.4. *Trets comuns dels ajustaments*

No obstant la incertesa en el mapa axial de densitat electrònica, s'han trobat trets comuns als 5 possibles mapes, cadascun dels quals ha estat ajustat unívocament amb unes certes restriccions geomètriques.

#### 9.5.4.1. **Dos dels tres parells de la cel·la elemental tenen perfils similars**

Els 5 possibles mapes de densitat electrònica compatibles amb les restriccions imposades (figura 9.9) tenen en comú que, dels tres parells que formen la cel·la elemental, dos parells tenen un perfil axial similar, mentre que l'altre és sensiblement diferent. Aquesta observació és compatible amb el fet que la simetria dels filaments primers i els filaments gruixuts no és commensurable (a l'escala de la longitud dels filaments).

#### 9.5.4.2. **La rotació intrínseca relativa dels caps de cada parell és petita**

Respecte de l'angle de *spin*, aquest es manté entre  $-90^\circ$  i  $-190^\circ$  per a tots els caps, uns valors que coincideixen amb els del segon ajustament realitzat amb l'estructura simplificada. La diferència d'angles de *spin* entre els dos caps de miosina d'un parell és petita, uns  $20^\circ$  de mitjana i, en cap cas, major de  $60^\circ$ . Aquesta petita diferència porta a que els possibles punts d'enllaç de la miosina amb l'actina se situïn aproximadament a la mateixa orientació i, per tant, puguin establir els mateix enllaç estereoespecífic.

### **9.5.4.3. La inclinació dels caps respecte dels filaments és similar i quasi perpendicular**

Els dos caps de cada parell tenen un angle respecte als filaments similars, ca.  $-11^\circ$  i ca.  $-17^\circ$ , amb una lleugera diferència sistemàtica en tots els ajustaments. El signe igual per als dos caps indica que apareixen inclinats en la mateixa direcció, si bé no es pot determinar si aquesta és cap al centre o cap a l'extrem del filament.

L'angle que formen els dos caps del parell respecte dels filaments és, per tant, quasi perpendicular. Aquesta situació és diferent a la trobada anteriorment en l'estat de contracció isomètrica, en el qual només un dels caps del parell té una orientació perpendicular.